



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO CRACK EMPREGANDO O ORGANISMO-TESTE *Perna perna*

ANDRESSA DOS SANTOS BARBOSA ORTEGA

SANTOS

2018

ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO CRACK EMPREGANDO O ORGANISMO-TESTE *Perna perna*

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada, do Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas e Instituto do Mar, da Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema /Baixada Santista

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Alves Maranhão

SANTOS, 2018

Ortega, Andressa dos Santos Barbosa

Análise da citotoxicidade e genotoxicidade do crack empregando o organismo-teste *Perna perna*/ Andressa dos Santos Barbosa Ortega – Santos, 2018.

64 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada) – Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Alves Maranhão

1. Crack 2.poluentes emergentes 3.biomarcadores 4.*Perna perna*
5.drogas ilícitas I.Título

CDD 577.727

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe Marise, minha avó Alice e minha tia Anézia, pelo amor e apoio incondicionais que têm por mim.

Agradecimentos

Agradeço a todos que ajudaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho. Em primeiro lugar à minha família, por sempre me apoiar e estar presente nos momentos de dificuldade. Em especial, à minha mãe, pelo amor, dedicação e apoio.

Agradeço ao querido orientador Prof. Camilo Dias Seabra Pereira, que desde a graduação me incentiva a buscar novos conhecimentos científicos, estando sempre ao meu lado, apoiando, ensinando e motivando ao longo de toda a minha caminhada acadêmica.

À querida coorientadora, Prof. Luciane Alves Maranhão, que durante toda a realização deste trabalho esteve presente, com ensinamentos, palavras amigas e de incentivo para o êxito deste trabalho.

Ao Prof. Daniel Araki Ribeiro, pela cooperação na obtenção do objeto de estudo, proporcionando a execução deste trabalho.

Agradeço à equipe Ecotox da Baixada Santista. Em especial, Fabio Pusceddu, Fernando Cortez, Aldo Santos, Beatriz Moreno, Mayana Fontes, Lorena Souza, Rafael Dymes, Jonas Rosa, Heloísa Franco, Matheus Mascarin, Caio Nobre, Rafael Solé, Lucas Monteiro e Aline Saturnino por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, Erick, Conde, Fernanda, Larissa, Melissa e Caíque que mesmo nos momentos em que estive ausente souberam entender e me apoiaram para conclusão desta etapa. Às amigas Carol, Júlia, Victória, Lauryne e Alessandra pelo apoio e amizade. Aos amigos do mestrado, Arnaldo, Larissa, Marcos e em especial ao querido Auro, pelas viagens a Diadema, horas de conversa, experiências trocadas e ajudas infinitas na nossa jornada científica, vida longa e próspera a nossa amizade.

À querida professora e amiga Tania Vazquez, por todos os ensinamentos transmitidos.

À querida vizinha Prof. Mary do Careno, que é um exemplo de dedicação aos estudos e que sempre me incentivou a continuar.

À professora Ana Margareth, minha primeira professora de biologia, quem abriu meus olhos para a ciência, pelo seu amor ao ensino e incentivo à profissão.

À Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio institucional e pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Às Universidades Santa Cecília e Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), pelos espaços e equipamentos cedidos para exposição dos organismos e ensaios realizados.

Às agências de fomento à pesquisa, pelo apoio financeiro. À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e à FAPESP, pelo financiamento deste estudo (Projeto #2015/17329-0).

Sumário

Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	V
Resumo	VI
Abstract	VII
1.Introdução	1
2.Objetivos	5
3.Material e Métodos	6
3.1.Obtenção do Crack	6
3.1.1. Extração em fase sólida (EFS)	6
3.2.Organismo-teste Perna perna	7
3.3.Exposição dos organismos e extração dos tecidos	9
3.4.Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)	10
3.5.Preparação das amostras para as análises bioquímicas	11
3.6.Proteínas Totais	12
3.7.Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	13
3.8.Dibenzilfluoresceína (DBF)	14
3.9.Glutationa S-Transferase (GST)	15
3.10.Glutationa Peroxidase (GPX)	15
3.11.Peroxidação lipídica (LPO)	16
3.12.Danos ao DNA mitocondrial (DNA strand breaks)	17
3.13.Colinesterase (ChE)	18
3.14.Análises dos resultados	19
4.Resultados	21
4.1.Concentração de cocaína na alíquota de crack empregado	21
4.2.Respostas ao Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)	21
4.3.Análise da atividade relacionada a EROD	22

4.4. Análise da atividade de DBF.....	23
4.5. Análise da atividade relacionada ao GST.....	25
4.6. Análise da atividade relacionada a GPX.....	27
4.7. Peroxidação lipídica (LPO).....	29
4.8. Danos mensurados ao DNA mitocondrial.....	31
4.9. Neurotoxicidade (ChE) mensurada em Perna perna	33
4.10. Índice IBR.....	36
5. Discussão	38
6. Considerações Finais.....	42
Referências Bibliográficas.....	43
Anexo I.....	50
Anexo II.....	51

Lista de Figuras

Figura 1. Organismos adultos de <i>Perna perna</i> . A: Organismo fêmea. B: Organismo macho.....	8
Figura 2. Exposição dos organismos em aquários de 20 L.....	9
Figura 3. Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro após 48, 96 e 168 horas de exposição de <i>P. perna</i> a três concentrações diferentes de crack. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	21
Figura 4. Atividade de EROD mensurada em brânquias do mexilhão <i>Perna perna</i> . * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	22
Figura 5. Atividade de EROD mensurada em glândula digestiva de <i>P. perna</i>	23
Figura 6. Atividade de DBF mensurada em brânquias do organismo-teste <i>Perna perna</i> . * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	24
Figura 7. Atividade de DBF mensurada em glândulas digestivas de <i>P. perna</i>	25
Figura 8. Atividade de GST mensurada em brânquias do mexilhão marinho. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	26
Figura 9. Atividade de GST mensurada em glândulas digestivas de <i>P. perna</i> . * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	27
Figura 10. Atividade de GPX mensurada em brânquias de <i>P. perna</i> . * Diferença significativa com o controle de solvente ($p<0,05$).....	28
Figura 11. Atividade relacionada à GPX no tecido de glândulas digestivas de <i>Perna perna</i>	29
Figura 12. Peroxidação lipídica mensurada em brânquias de <i>Perna perna</i>	30
Figura 13. Peroxidação lipídica mensurada em glândulas digestivas do mexilhão marinho <i>Perna perna</i>	31

Figura 14. Danos ao DNA mitocondrial causados pela exposição ao crack no tecido de brânquias de <i>P. perna</i> . * Diferença significativa com o controle de solvente (p<0,05).....	32
Figura 15. Danos ao DNA mitocondrial no tecido de glândulas digestivas do organismo-teste.....	33
Figura 16. Neurotoxicidade mensurada nos tecidos de brânquias de <i>P. perna</i>	34
Figura 17. Neurotoxicidade em glândulas digestivas de <i>Perna perna</i>	35
Figura 18. Neurotoxicidade no tecido de músculo adutor de <i>Perna perna</i>	36
Figura 19. Índice IBR para brânquias do mexilhão <i>Perna perna</i> exposto ao crack (nas concentrações de 0,5, 5 e 50 µg.L ⁻¹) em três diferentes tempos (48, 96 e 168h).....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros do Modo de Monitorização de Reação Múltipla (MRM).....	7
Tabela 2. Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas.....	11
Tabela 3. Valores da curva de calibração utilizada com BSA para quantificação das proteínas totais.....	13
Tabela 4. Valores da curva de calibração utilizada para o ensaio de EROD.....	14
Tabela 5. Valores da curva de calibração utilizada para o ensaio de DBF.....	15
Tabela 6. Valores da curva de calibração utilizada no ensaio de LPO.....	17
Tabela 7. Valores da curva de calibração utilizada no ensaio de danos ao DNA.....	18

Resumo

O crack é o principal subproduto da cocaína, sendo considerado uma droga epidêmica em grandes centros urbanos. A cocaína, vêm ganhando visibilidade em estudos sobre os efeitos em organismos aquáticos, já que sua presença foi identificada em matrizes aquáticas de diferentes países em concentrações-traço, porém, estudos relacionados aos efeitos do crack à biota aquática ainda são escassos. Nesse panorama, este estudo realizou uma avaliação dos efeitos subletais do crack no bivalve *Perna perna*, que possui ocorrência global, e vem sendo utilizado como bioindicador em programas de monitoramento ambiental. Os mexilhões foram expostos à uma concentração ambiental ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) e concentrações 10 e 100 vezes maiores durante 168 horas, com retirada de hemolinfa, brânquias, glândulas digestivas e músculo adutor a cada dois dias para realização de uma bateria de biomarcadores (EROD, DBF, GST, GPx, avaliação da peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA mitocondrial (DNA strand break), colinesterase (ChE) e avaliação da estabilidade lisossomal (TRCVN)). O aumento significativo das atividades de EROD e DBF foram observadas somente nas brânquias. Houve aumento da atividade de GST no tecido de brânquias, porém observou-se a diminuição desta atividade em glândulas digestivas do mexilhão. A defesa antioxidante mensurada através de GPX foi elevada somente em brânquias após dois dias de exposição. Não foi observada peroxidação lipídica, nem atividade da colinesterase em nenhum tecido analisado, porém foram observados danos ao DNA mitocondrial em brânquias e glândulas digestivas. Foram observadas alterações na estabilidade da membrana lisossomal em todas as concentrações de crack testadas. Nossos resultados demonstraram que o crack parece ser metabolizado por atividade *CYP like* e GST em brânquias, e ser capaz de gerar espécies reativas de oxigênio que aumentaram a atividade antioxidante e causaram danos ao DNA e à membrana lisossômica do mexilhão *Perna perna*.

Palavras-chave: Crack; poluentes emergentes; biomarcadores; *Perna perna*; drogas ilícitas

Abstract

Crack cocaine is the main by-product of cocaine, being considered an epidemic drug in urban areas. Cocaine has been a target of recent studies, since its presence has been identified in aquatic matrices in different countries in low concentrations, but studies related to crack cocaine effects to the aquatic biota still scarce. From this perspective, the present study assessed the sublethal effects of crack cocaine in the mussel *Perna perna*, which has a large occurrence in tropical and subtropical environments and it is used as a bioindicator in environmental monitoring programs. The adult mussels were exposed to an environmental concentration ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) and concentration 10 and 100 times higher for 168 hours. Hemolymph, gills, digestive glands and adductor muscles were dissected every two days to be analyzed using a suite of biomarkers (Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), Dibenzyfluorescein (DBF), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPX), assess of lipid peroxidation (LPO), mitochondrial DNA damage (DNA strand break), cholinesterase (ChE) and assess the lysosomal stability (LMS). The significant increase of EROD and DBF activities was observed only in the gills. It was observed an increase of GST activity in gills, but it was observed a decrease of this activity in digestive glands. The antioxidant defenses measured by GPX were elevated only in the gills after two days of exposure. It was not observed lipid peroxidation, neither cholinesterase activity in any tissue, but it was observed mitochondrial DNA damage in gills and digestive glands. Alterations in LMS were observed in all crack cocaine concentrations. Our results demonstrated that the crack cocaine seems to be metabolized by CYP like and GST activities in gills, being able to generate oxygen-reactive species which increases the antioxidant activity and caused damage to DNA damage as well as to the lysosomal membrane of the mussel *Perna perna*.

Key words: Crack cocaine; emerging pollutants; biomarkers; *Perna perna*; illicit drugs

1.Introdução

Produtos de cuidado pessoal, fármacos e drogas ilícitas são considerados poluentes orgânicos emergentes (POE), substâncias que podem causar danos adversos à organismos não-alvo, não possuem regulamentação na legislação ambiental e não fazem parte de programas monitoramento ou avaliação da qualidade ambiental. Sendo tais substâncias de uso cotidiano ou de uso abusivo, podem ser consideradas fontes de grave contaminação do ambiente aquático (Gavrislescu et al., 2015). Drogas ilícitas e seus metabólitos são considerados POE (Pal et al., 2013), devido à elevada atividade biológica, propriedades psicoativas e efeitos desconhecidos para os organismos aquáticos (Baker et al., 2012, Castiglioni et al., 2011).

As drogas ilícitas podem ser divididas em quatro grupos principais: os canabinóides, anfetaminas, opióides e cocaína (Castiglioni et al., 2011). Estima-se que o uso mais problemático da cocaína e seus derivados seja nas Américas, principalmente no Brasil, que é responsável por 20% do consumo global da cocaína e seus derivados, por fatores como a aglomeração de pessoas em grandes centros urbanos e pela localização geográfica estratégica, sendo considerado uma rota de tráfico para a Europa, principalmente através de seus portos. O Brasil é considerado o segundo maior mercado de cocaína e o maior de crack no mundo (UNODC, 2016, 2014; Laranjeira et al., 2013)

A cocaína (COC) é extraída de uma planta nativa (*Erythroxylum coca*) de países como Bolívia, Colômbia e Peru. A civilização Inca descobriu as propriedades analgésicas da folha de coca, capaz ainda de trazer sensação de saciedade da fome e combater a fadiga, sendo utilizada até os dias atuais por povos da região andina (Benowitz, 1993). É um composto alcalóide, com a característica de ser altamente hidrofílico e também lipofílico, age indiretamente nos receptores do neurotransmissor dopamina, acentuando sua ação, gerando sensações de euforia e excitação (Nestler, 2004; Carlini et al., 2001). Após a inalação, a cocaína é rapidamente metabolizada. Seus principais metabólitos humanos são a benzoilecgonina (BZE), a ecgonina metil ester e a norcocaína (Pasanen et al., 1995; Zhang & Foltz, 1990).

Através da adição de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) à cocaína, obtém-se o crack, um de seus principais subprodutos, tornando-se um composto pouco solúvel

em água e com temperatura de ebulição baixa (90°C), o que possibilita a pirólise do crack (Florence & Attwood, 2006). O primeiro relato do uso de crack no Brasil foi em 1989 na cidade de São Paulo. Seu uso aumentou exponencialmente nos anos 90 pelo baixo custo e efeitos intensos, sendo considerada até hoje uma epidemia, principalmente em grandes centros urbanos (Pulcherio et al., 2010; Ribeiro et al., 2006).

O aporte de POE, como as drogas ilícitas ao ambiente aquático se dá principalmente por efluentes domésticos, em regiões costeiras, através de emissários submarinos (Pereira et al., 2016). Estudos apontam a presença da cocaína e seus metabólitos em matrizes aquáticas em diversos países, em estações de tratamento de esgoto (ETE) e em ecossistemas continentais, quantificados em países como Austrália, Colômbia, Grécia, Inglaterra, França, Espanha, Canadá, Itália e Bélgica (Lai et al., 2016; Hernández et al., 2015; Borova et al., 2014; Baker & Kasprzyk-Hordern, 2013; Nefau et al., 2013; Postigo et al., 2010; Metcalfe et al. 2010; Mari et al., 2009; van Nuijs et al., 2009). Ainda em ambientes de água doce, Thomas et al. (2014) identificaram cocaína e seu metabólito nas águas de dois igarapés afluentes do Rio Negro, em Manaus, nas concentrações de 800-5900 ng.L⁻¹ e 1600-3600 ng.L⁻¹, respectivamente. Campestrini & Jardim (2016) notificaram a presença da cocaína e seu principal metabólito em água potável (COC: 22 ng.L⁻¹/ BZE: 652 ng.L⁻¹) e de rios do estado de São Paulo (COC: 62 ng.L⁻¹/ BZE: 1019 ng.L⁻¹). Já em ambientes estuarino e marinho, Klosterhaus et al. (2013) quantificaram a presença de cocaína (2,4 ng.L⁻¹) e benzoilecgonina (2,8-7,2 ng.L⁻¹) na Baía de São Francisco, Estados Unidos. Pereira et al. (2016) detectaram níveis de cocaína entre 21,5 e 537 ng.L⁻¹, valores semelhantes a cafeína e para a benzoilecgonina valores entre 4,6 e 19,5 ng.L⁻¹ na Baía de Santos - SP.

Mesmo em baixas concentrações, esses compostos extremamente bioativos como as drogas ilícitas podem causar efeitos subletais em organismos não-alvo. Diversos estudos foram publicados a fim de demonstrar os danos causados por essas drogas psicoativas em diversos modelos, como efeitos deletérios na atividade cognitiva em usuários da forma alcaloide da cocaína (Hoff et al., 1996); significantes reações tóxicas ao pulmão de usuários de crack (Haim et al., 1995); o possível desenvolvimento de úlcera de córnea em usuários de crack (Ghosheh et al., 2007); o potencial carcinogênico do crack investigado em células de mucosa oral de usuários

(Oliveira et al., 2014); alterações hepáticas em ratos expostos a cocaína (Mehanny & Abdel-Rahman 1991); efeitos comportamentais em peixes *Danio rerio* expostos a cocaína (López-Patiño et al., 2008); efeitos citogenotóxicos em mexilhões de água doce (*Dreissena polymorpha*) expostos à cocaína (Binelli et al., 2012) e benzoilecgonina (Parolini et al., 2013) e alterações histopatológicas na pele e intestino de enguias *Anguilla anguilla* expostas a concentrações ambientais de cocaína (Gay et al., 2016).

Efeitos subletais podem ser mensurados através da aplicação de uma extensa bateria de respostas bioquímicas e celulares. Biomarcadores podem ser definidos como mudanças nas respostas biológicas, desde moleculares à comportamentais, relacionadas à exposição ou efeitos de contaminantes químicos. O uso de biomarcadores em diversos níveis de organização celular tem sido proposto como uma ferramenta eficaz para a detecção dos primeiros sinais de efeitos biológicos na avaliação da qualidade ambiental (Van der Oost et al., 2003; Cajaraville et al., 2000)

A biotransformação de substâncias orgânicas estranhas ao sistema biológico (xenobióticos) possui duas principais fases. A primeira fase está relacionada a reações de oxidação, redução e hidrólise, induzidas pela atividade da família de enzimas do citocromo P450, pertencente à família de hemoproteínas CYP450, capazes de reduzir o teor de carbono destas substâncias (Van der Oost et al., 2003; Goeptar et al., 1995). A atividade de etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) provou ser uma resposta catalítica sensível para mensurar a indução da atividade do citocromo P450 1A em ratos, humanos e peixes (van der Oost et al., 2003;). Já em bivalves, tal indução foi mensurada através das atividades de EROD e DBF (P450 1A-like e 3A-like, respectivamente) (Binelli et al., 2012; Gagné et al., 2007a).

A fase II da biotransformação está ligada ao processo de conjugação com a glutathione, a fim de tornar os xenobióticos mais solúveis. Sua atividade pode ser mensurada através das atividades da isoenzima Glutathione S-Transferase (GST). O metabolismo em geral produz espécies reativas de oxigênio, acionando desta maneira, as defesas antioxidantes. Tal atividade pode ser avaliada através da enzima Glutathione Peroxidase (GPX), responsável pela redução de radicais livres e consequentemente prevenindo o estresse oxidativo (van der Oost et al., 2003; Cheung et al., 2001).

Quando o sistema de enzimas antioxidantes está sobrecarregado, ocorre o estresse oxidativo e o seu principal dano é a peroxidação lipídica (LPO) devido a oxidação de ácidos graxos e radicais livres, dando origem a malondialdeídos (MDA) e gerando danos à membrana lipídica das células (Gutteridge, 1995; Bonnes-Taourel et al., 1992). Outro dano causado pelo aumento de radicais livres é o dano ao DNA mitocondrial, causando fragmentações simples ou duplas, podendo levar à necrose e apoptose (Van der Oost et al., 2003; Collins et al., 1995)

A atividade da enzima colinesterase (ChE) possui importante função no sistema nervoso e pode ser inibida por compostos neurotóxicos. Tal inibição pode levar a um acúmulo da acetilcolina na sinapse, ocasionando a interrupção da função nervosa (Domingues et al., 2010; Garcia et al., 2000).

A viabilidade celular pode ser avaliada através do ensaio do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro (TRCVN), um importante biomarcador de estresse fisiológico. Este ensaio avalia o extravasamento do conteúdo lisossomal para o citoplasma através da exposição de hemócitos ao corante vermelho neutro, com base em critérios de avaliação entre células saudáveis e células estressadas (Mamaca et al., 2005; Dailianis et al., 2003).

Pouco se sabe sobre os efeitos causados pelo crack em invertebrados marinhos, o que evidencia a importância da avaliação de tais efeitos biológicos adversos. Nesse panorama, este estudo pôde determinar as respostas bioquímicas e fisiológicas da droga ilícita crack em um bivalve marinho de ampla ocorrência em ambientes subtropicais.

2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos subletais causados pela droga ilícita crack em ambientes costeiros empregando o mexilhão *Perna perna* (Mollusca-Bivalvia) como bioindicador. Para tanto, estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos:

- Elucidar o metabolismo envolvido na biotransformação (fase I e II) e avaliação de estresse oxidativo causado pelo crack ao bivalve *P. perna*;
- Analisar a citogenotoxicidade do crack no mexilhão marinho *P. perna* através da avaliação da estabilidade da membrana lisossomal, peroxidação lipídica e danos em DNA mitocondrial;
- Avaliar a neurotoxicidade através da atividade da enzima colinesterase no mexilhão *P. perna*.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção do Crack

As alíquotas de crack foram obtidas a partir da colaboração com o Prof. Daniel Araki Ribeiro (Unifesp, Campus Baixada Santista). O crack investigado no presente estudo foi cedido pela 2ª vara criminal do Fórum de Limeira, a partir de despacho de Vossa Excelência, Sr. Juiz de Direito Luiz Augusto Barrichello Neto, Proc. Nº 3012156 - 28.2013.8.26.0320, Ordem nº 1122/2013 (Anexo I).

A análise quantitativa de concentração real de cocaína no lote de crack utilizado, assim como as concentrações de cocaína inicial (T0) e após 24 h (T24) nas soluções-teste nos ensaios ecotoxicológicos foram analisadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada do Instituto de Pesquisas Nucleares da Universidade de São Paulo (CEMSA/USP), em Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massas (LC-MS/MS) híbrida, tipo quadrupolo linear íon trap (LC-QqLIT), no modo positivo em Monitorização de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar a concentração de cocaína. Os resultados foram expressos em porcentagem de cocaína.

3.1.1. Extração em fase sólida (EFS)

A concentração de cocaína na alíquota de crack utilizada dos ensaios ecotoxicológicos foi analisada por Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massas (LC-MS/MS) híbrida, tipo quadrupolo linear íon trap (LC-QqLIT), no modo ESI (positivo e negativo) e Modo de Monitorização de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e um produto de íons para quantificar e qualificar a cocaína (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros do Modo de Monitorização de Reação Múltipla (MRM).

Substância	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng·L ⁻¹)	LOQ (ng·L ⁻¹)	RT (min.)
Cocaína	304,2	182,2	36	27	4	3,0	12,0	3,90
		105,1	36	39	4			

Legenda: Q1 (primeiro quádruplo); Q3 (último quádruplo); DP (Potencial de declustering); CE (Energia de colisão); CXP (Potencial de saída de colisão); LOD (limites de detecção); LOQ (Limites de quantificação); RT (Tempo de Retenção); Q3, célula superior íon quantificador e na célula inferior íon qualificador.

3.2. Organismo-teste *Perna perna*

Entre os organismos marinhos, os bivalves ganharam relevância global como bioindicadores e têm sido empregados em programas de biomonitoramento de águas costeiras (Pereira et al., 2014a, 2007; Maranhão et al., 2012; Gagné et al., 2007a, b). Estes organismos possuem ampla distribuição geográfica, disponibilidade em campo e através da aquicultura, além da adequação para experimentos em laboratório e *in situ* (Cajarville et al., 2000).

O mexilhão *Perna perna* possui hábito bentônico, sendo encontrado em bancos naturais entre a região do entremarés até a zona infralitoral, sua ocorrência é mais frequente em áreas de incidência direta de ondas e de alto hidrodinamismo. São organismos suspensívoros filtradores e sua alimentação consiste em fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão. É uma espécie eurihalina e euri térmica, possuindo assim, grande capacidade de suportar variações ambientais. São dióicos, sem dimorfismo sexual externo e sua reprodução ocorre de forma sexuada, através de liberação de gametas na coluna d'água. A diferenciação sexual é feita através da coloração das gônadas dos organismos adultos, sendo de coloração alaranjada nas fêmeas e coloração esbranquiçada nos machos (Figura 1). Este organismo foi previamente validado como um organismo-teste recomendado para avaliações de qualidade ambiental na costa brasileira. (Pereira et al., 2012, 2011, 2007; Resgalla Jr. et al., 2008; Abessa et al., 2005).

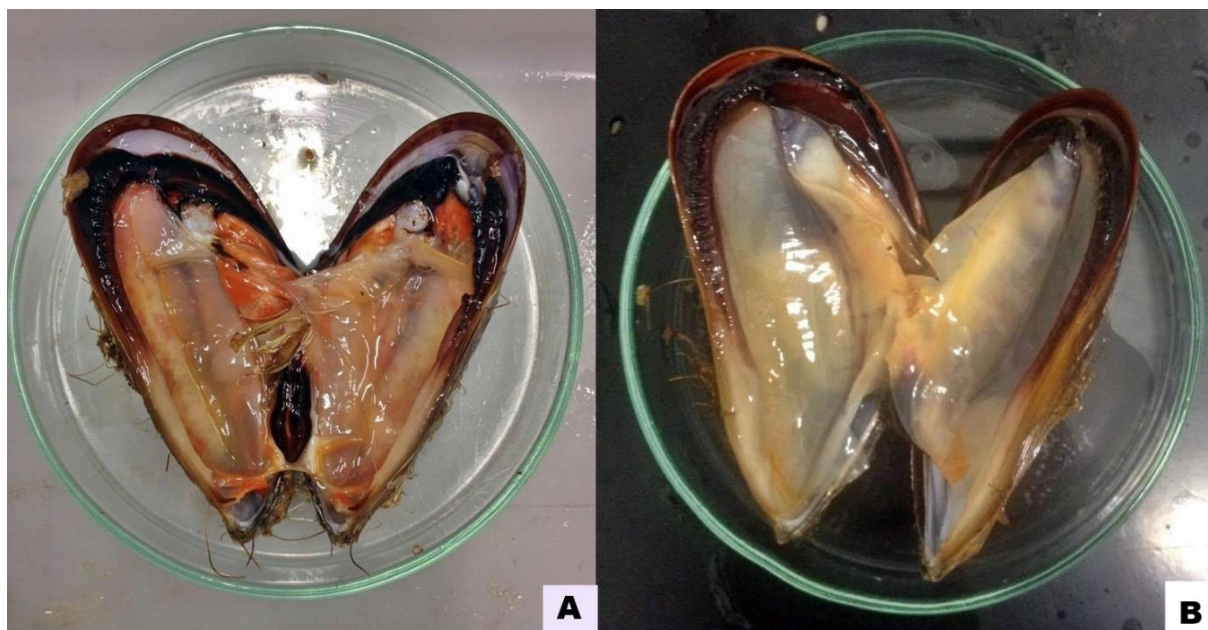


Figura 1. Organismos adultos de *Perna perna*. A: Organismo fêmea. B: Organismo macho.

Os exemplares do mexilhão *Perna perna* empregados neste estudo foram adquiridos de cultivos localizados na praia da Cocanha (Caraguatatuba – SP). Os organismos foram transportados em caixas térmicas até o laboratório, onde foram mantidos em aquário com água do mar filtrada, sob aeração e temperatura constante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por uma semana, para aclimação. Após esse período, foi realizada a exposição dos organismos ao composto estudado.

Os tecidos escolhidos para este estudo foram as brânquias, glândula digestiva e músculo adutor, além da hemolinfa. As brânquias, também chamados ctenídeos, são estruturas filamentosas e estão relacionadas com a circulação de água, trocas gasosas e a obtenção de alimento. A glândula digestiva é uma estrutura de coloração marrom, que envolve o estômago e parte do intestino. É neste local onde ocorre a digestão intracelular, já que no estômago destes organismos ocorre somente um processo inicial de digestão extracelular. O músculo adutor é encontrado na região posterior do organismo. Tem como função abrir e fechar as valvas, quando contraído promove o fechamento das conchas, de maneira oposta, quando relaxado promove o afastamento das conchas. Por último, a hemolinfa é composta por células circulantes e o plasma, possuindo aparência leitosa. Compõe o sistema imunológico e circulatório destes organismos, que é composto de um coração, veias, artérias e hemolinfa (Resgalla Jr. et al, 2008; Narchi & Galvão-Bueno, 1997).

3.3. Exposição dos organismos e extração dos tecidos

Para avaliação das respostas bioquímicas e fisiológicas foram conduzidos ensaios semi-estáticos com exposição de 168 horas, sob condições controlas em laboratório (20 ± 2 °C, aeração constante, fotoperíodo de 12h, salinidade 35 e pH 8).

O crack foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO 0,001%). Foram utilizados três aquários para cada concentração testada, controle (água do mar) e controle solvente (água do mar e DMSO (0,001%)), totalizando assim, 15 aquários. Cada aquário recebeu 10 mexilhões ($n=30$ por tratamento) e 10 litros de água do mar, atingindo a proporção de um mexilhão por litro.

Tanto a água como as soluções teste foram trocadas a cada 24 horas para garantir uma constante presença de crack. As concentrações de crack utilizadas foram baseadas na concentração de cocaína máxima determinada na Baía de Santos ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Pereira et al., 2016), assim como concentrações 10 ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$), e 100 vezes ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) maiores que a concentração ambiental.

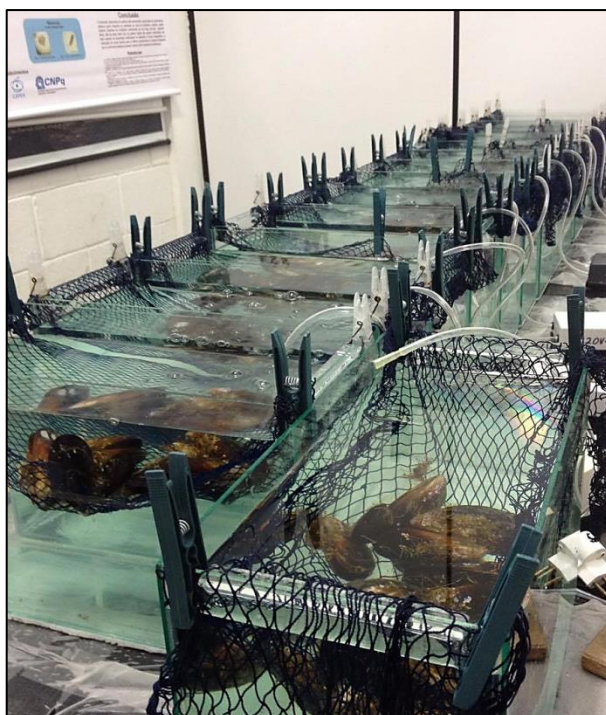


Figura 2. Exposição dos organismos em aquários de 20 L.

A cada 48 horas de exposição, dez organismos de cada concentração foram retirados aleatoriamente e dissecados, sendo retirados glândulas digestivas, brânquias e músculos adutores. Amostras de hemolinfa destes mesmos organismos foram coletadas para a realização do TRVCN. Os tecidos foram conservados em laboratório a -80°C até posterior homogeneização.

3.4. Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)

O dano causado pelo crack em organelas foi avaliado através do ensaio de TRVCN (em inglês: Neutral Red retention time – NRRT) de acordo com o que foi proposto por Lowe et al. (1995). Este ensaio tem como objetivo detectar alterações na permeabilidade lisossomal de hemócitos do bivalve *Perna perna*.

Para tal ensaio foi preparada uma solução fisiológica constituída por 4,77 g de HEPES, 25,48 g de NaCl, 13,06 g de MgSO₄, 0,75 g de KCl e 1,47 CaCl₂ diluídos em 1L de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7,36, a salinidade para 36 e mantida em temperatura ambiente. Em um frasco âmbar foram adicionados 28,8 mg do corante em questão diluídos em 1 mL de DMSO. A solução de trabalho foi preparada com 10 µL da solução estoque diluídos em 5 mL da solução fisiológica, mantida no escuro.

Com o auxílio de uma faca, as valvas dos bivalves foram distanciadas e foi introduzida no músculo adutor do mexilhão uma pequena seringa com agulha padrão 21, previamente preenchida com 0,5 mL de solução fisiológica, onde foram retirados 0,5 mL de hemolinfa. A solução com hemolinfa foi depositada em microtubos e incorporada à solução fisiológica por leve inversão. Em seguida, 40 µL dessa solução foram depositados em uma lâmina previamente tratada com 10 µL de poly-L-lisina e armazenadas em uma câmara úmida e escura durante 15 minutos. Após esse tempo, o excesso de hemolinfa foi cuidadosamente retirado e ainda dentro da câmara escura, cada lâmina recebeu 40 µL do corante vermelho neutro e armazenadas por mais 15 minutos. Logo após, o excesso de corante foi retirado e com o auxílio de uma lamínula, as lâminas foram montadas e levadas para leitura ao microscópio, em aumento de 400x.

Ao final de cada leitura, as lâminas foram novamente levadas à câmara escura e úmida por mais 15 minutos. O procedimento foi repetido até as células apresentarem

extravasamento do corante. Após extravasamento celular, a análise foi interrompida e o tempo de retenção anotado, não ultrapassando tempo total de 120 minutos. Os critérios para a diferenciação de células saudáveis e estressadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas.

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
Formato das células	Irregular	Arredondado
Tamanho das células	Aumentado	Diminuído
Número de lisossomos	Aumentado	Diminuído
Tamanho dos lisossomos	Menores	Alargados/ Aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido/ rosado	Vermelho ou rosa escuro
Pseudópodes	Não visíveis	Visíveis
Corante extravasado no citosol	Não visíveis	Visíveis

Fonte: King (2000)

Em cada leitura realizada foram observadas as características das células, considerando-se três classificações possíveis: “+” quando mais de 90% das células observadas não apresentaram sinais de estresse; “+/-” quando a ausência de estresse esteve presente entre 90 e 50% das células e “-” quando mais de 50% das células exibiram deformidades e extravasamento do corante para o meio extracelular (King, 2000).

Após o término das análises realizadas, os organismos foram dissecados por rompimento do músculo adutor, sendo que brânquias, glândulas digestivas e músculos adutores foram acondicionados em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise de outros biomarcadores.

3.5. Preparação das amostras para as análises bioquímicas

Para homogeneização dos tecidos, os mesmos foram descongelados sobre gelo e homogeneizados com solução tampão. A solução tampão de homogeneização foi preparada utilizando TRIS (50mM), EDTA (1mM), DTT (1mM), sacarose (50mM), KCl (150mM) diluídos em 250 mL de água Milli-Q® (pH 7,6). Preparou-se uma solução de PMSF (100mM) diluído em 1mL de etanol. A solução tampão utilizada para homogeneização foi preparada da junção destas duas soluções, sendo adicionados

100 μ L da solução de PMSF em 30 mL do tampão de homogeneização, mantida sobre o gelo e envolto em papel alumínio.

Cada alíquota de tecido foi pesada para a adição de solução tampão (1:3). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador, e as alíquotas separadas para posterior análise. Danos em DNA (strand breaks), peroxidação lipídica (LPO) e a mensuração de proteínas totais foram determinadas nas amostras de homogeneização de glândula digestivas e brânquias.

Após a separação das amostras de homogeneizado, cada extrato foi centrifugado a 4°C, a 15.000 g durante 20 minutos, obtendo-se assim, a fração S15 (sobrenadante de 15.000 g). A partir do S15 de glândulas digestivas e brânquias foram determinadas as atividades enzimáticas de EROD, DBF, GST, GPX e ChE. Já para o músculo adutor foi determinada apenas a atividade de ChE. A concentração de proteínas totais existentes na fração celular citoplasmática foi determinada nos três tecidos em questão.

Todas as amostras foram congeladas em ultrafreezer (-80°C) para posterior determinação das diferentes respostas bioquímicas.

3.6. *Proteínas Totais*

O teor de proteínas totais foi determinado para cada extrato de acordo com o método de Bradford (1976).

Em ensaio preliminar, uma amostra de cada tecido foi testada para avaliação da diluição que seria utilizada para que não ultrapassasse o limite da curva de calibração. Para músculo adutor e brânquias (homogeneizado e centrifugado) foi estabelecida uma diluição com água Mili-Q de 1:10, já para glândula digestiva, a fração homogeneizada foi diluída numa proporção de 1:10 e a fração centrifugada, 1:20.

Para a quantificação do teor de proteínas totais se fez necessária a preparação de uma curva de calibração com Albumina de Soro Bovino (BSA). A partir de uma solução estoque de BSA de 2 mg.L⁻¹, posteriormente diluída em água Milli-Q®, obtendo-se cinco concentrações: 0, 0,21 mg.L⁻¹, 0,42 mg.L⁻¹, 0,7 mg.L⁻¹ e 1,04 mg.L⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Valores da curva de calibração utilizada com BSA para quantificação das proteínas totais.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Volume de água Mili-Q® (µL)	Volume BSA (µL)
0	100	0
0,21	85	15
0,42	70	30
1	50	50
1,5	25	75

Para montagem das placas, foram necessários 20 µL da amostra de tecido previamente diluído na solução tampão de homogeneização em duplicata e 180 µL do reagente Bradford, que foram depositadas em placa transparente, juntamente com o “branco”, composto pela solução tampão de homogeneização, também em duplicata. Incubou-se a placa no escuro por 20 minutos à temperatura ambiente antes da leitura no equipamento Synergy HT-Biotek®, onde foi realizada a leitura em absorbância de 595 nm. Os resultados foram expressos por mg.mL⁻¹.

3.7. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade de EROD foi determinada utilizando-se o ensaio adaptado de Gagné & Blaise (1993) e Siebert et al. (2017).

Inicialmente, foram preparados um substrato tampão com 1,5142 g de Trizma base e 1,50 mL de TWEEN 20 diluídos em 500 mL de água Mili-Q®, com o pH ajustado para 7,4 e um substrato de etoxiresorufina, com 0,006 g de resorufin ethyl ether (5mM), diluído em 5 mL de DMSO. Em seguida foi preparado o substrato de etoxiresorufina, utilizando-se 40 mL do substrato tampão e 40 µL do substrato de etoxiresorufina. Após foi preparada uma solução de NaOH (0,02 mM) acondicionada em geladeira. Em seguida, uma solução de NADPH (4mM) diluída em 20mL de NaOH foi preparada e separada alíquotas de 1 mL em microtubos a -20°C e descongelados para o uso. A solução estoque de resorufin (5mM) foi preparada com 0,06 g de resorufin diluídos em 5 mL de DMSO.

A curva de calibração utilizada foi composta de 10 µL da solução estoque de resorufin diluídos em 9,990 mL de DMSO, a solução tampão de homogeneização, o substrato de etoxiresorufina e NADPH (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da curva de calibração utilizada para o ensaio de EROD.

Concentração (nmol.mL ⁻¹)	Volume Resorufin (µL)	Sol. Tampão de Homog. (µL)	Substrato Etoxiresorufina (µL)	NADPH (µL)
0	0	50	160	10
0,01	2	48	160	10
0,025	5	45	160	10
0,05	10	40	160	10
0,1	20	30	160	10
0,15	30	20	160	10
0,2	40	10	160	10

Para a preparação da leitura tanto das amostras quanto da curva de calibração, foram utilizadas placas escuras (para as placas com amostra de tecido foram adicionados 50 µL da amostra em duplicata e 160 µL do substrato de etoxiresorufina). Após a montagem das placas, incubou-se as placas 10 minutos no escuro a 30°C e depois adicionou-se 10 µL de NADPH para iniciar a leitura no fluorímetro.

A leitura foi realizada através de filtros de fluorescência de 485 nm (excitação) e 580 nm (emissão), durante 1 hora com intervalos de 15 minutos. Os resultados foram expressos em pmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína total.

3.8. Dibenzilfluoresceína (DBF)

A atividade relacionada a DBF foi determinada utilizando-se o método proposto por Gagné et al. (2007a). A solução de NaOH (0,02mM) e o substrato tampão foram reaproveitados do ensaio para a determinação da atividade de EROD.

Foi preparado um substrato estoque (10µM) com 5 mg de dibenzilfluoresceína diluídos em 1 mL de Acetonitrilo. Em seguida foi preparado um substrato de uso diário, com 51 µL do substrato estoque diluídos em 49,949 mL de solução tampão de homogeneização. O NADPH (1mM) utilizado neste ensaio foi diluído em 20 mL de NaOH. Após, foi preparada a solução de fluoresceína (5mM), utilizada na curva de calibração.

Para a preparação da curva de calibração foi utilizada uma placa preta, a solução de fluoresceína, a solução tampão de homogeneização, o substrato de DBF e NADPH (Tabela 5).

Tabela 5. Valores da curva de calibração utilizada para o ensaio de DBF.

Concentração (nmol.mL ⁻¹)	Volume Fluoresceína (μL)	Sol. Tampão de Homog. (μL)	Substrato (μL)	NADPH (μL)
0	0	50	160	10
0,01	2	48	160	10
0,025	5	45	160	10
0,05	10	40	160	10
0,1	20	30	160	10

Para a preparação das placas com as amostras, foram utilizados 50 μL do tecido a ser estudado, em duplicata, 160 μL do substrato e 10 μL do NADPH. Após adicionar o NADPH incubou-se as placas no escuro por 15 minutos antes da leitura, realizada com filtros de fluorescência a 485 nm de excitação e 516 nm de emissão, por 45 minutos com intervalos de 15 minutos, também em placa preta. Os resultados foram expressos em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína total.

3.9. *Glutathione S-Transferase (GST)*

A determinação da atividade de GST foi realizada de acordo com o que foi descrito por McFarland et al. (1999). Para este ensaio foi preparada uma solução de HEPES (10mM). Em seguida foi preparada uma solução de uso diário, com GSH (1mM), 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (1mM) e NaCl (125mM) diluídos em 250 mL de água Mili-Q, o pH foi ajustado para 6,5.

Em placas transparentes, foram adicionados 50 μL da fração centrifugada das amostras em duplicata e 200 μL da solução preparada anteriormente. A leitura foi realizada a 340 nm por 30 minutos com intervalos de 5 minutos. Os resultados foram expressos em OD GST min⁻¹.mg⁻¹ proteína total.

3.10. *Glutathione Peroxidase (GPX)*

A atividade de GPX foi determinada aplicando-se a metodologia descrita por Almeida et al. (2003). Para tal ensaio foram preparadas três soluções diferentes. A

primeira, uma solução tampão preparada com duas soluções, uma ácida e uma básica. A solução ácida foi preparada com KH_2PO_4 (50mM), EDTA (0,1mM) e azida sódica (0,15mM) diluídos em 500 mL de água Mili-Q®. Em seguida, foi preparada a solução básica, com K_2HPO_4 (50mM), EDTA (0,1mM) e azida sódica (0,15mM) diluídos em 1L de água Mili-Q®. A solução ácida foi misturada à básica de forma que o pH alcançasse 7,0.

Foi preparado também, um substrato com 97 μL de hidroperóxido de cumeno (1mM) em 50 mL de solução tampão. Esta solução foi incubada até o uso a 30 °C. Por último, foi preparada uma solução de uso diário com validade de 4 horas com 0,0461 g de glutathione reduzida e 0,0146 g de NADPH em 50 mL de solução tampão. Esta solução foi agitada e incubada a 30°C.

Em placas transparentes, foram adicionados 20 μL da fração centrifugada dos tecidos em duplicata e 200 μL da solução de uso diário, as placas foram incubadas a 30 °C por 2 minutos e depois foram adicionados 50 μL do substrato preparado previamente. Foram deixados dois pocinhos para o “branco”. A leitura foi realizada em 340nm de absorbância, durante 5 minutos com intervalos de 50 segundos. Os resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína total.

3.11. Peroxidação lipídica (LPO)

O ensaio para avaliação da peroxidação lipídica foi realizado de acordo com o que foi proposto por Wills' (1987). Para a realização deste ensaio, foram preparadas seis soluções, identificadas com letras de A à E.

A primeira solução (A), de HCl (0,1M), preparada com 3,64 mL de HCl diluídos em 996,36 mL de água Mili-Q®. A segunda solução (B), de tetrametoxipropano (TMP), com 10 μL de TMP diluídos em 9,99 mL da solução A. Tal solução foi diluída para chegar a diluição de 0,001%, ou seja, 10 μL da solução B diluídos em 990 μL de água Mili-Q. A solução C foi preparada com 0,279 g de FeSO_4 diluídos em 1L de água Mili-Q. A quarta solução (D) foi preparada com 250 mg de tricloroacético (TCA) diluídos em 225 mL da solução C. A sexta solução (E) foi preparada com 1,675 g de ácido tiobarbitúrico (TBA) diluídos em 250 mL de água Mili-Q®.

Em seguida, foi preparada uma curva de calibração, com as soluções de TMP, TCA e TBA. Todas as concentrações foram montadas em microtubos e incubadas em

banho maria a 70°C por 20 minutos, após, as amostras foram dispostas em uma placa preta para leitura (Tabela 6).

Tabela 6. Valores da curva de calibração utilizada no ensaio de LPO

Concentração ($\mu\text{m.L}^{-1}$)	Volume TMP 0,001% (μL)	Volume de água Mili-Q (μL)	Volume TCA (μL)	Volume TBA (μL)
0	0	150	300	150
0,6	6	144	300	150
1,5	15	135	300	150
3	30	120	300	150
4	40	110	300	150
6	60	90	300	150
10	100	50	300	150

Para a preparação das placas com amostras, foram necessários 150 μL da fração homogeneizada dos tecidos estudados, 300 μL da solução de TCA e 150 μL da solução de TBA, dispostos diretamente nos microtubos. As amostras foram incubadas em banho maria a 70°C por 20 minutos e em seguida colocadas 200 μL do sobrenadante em placa preta para leitura por fluorescência a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os resultados foram expressos em pmol TBARS $\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ proteína total.

3.12. Danos ao DNA mitocondrial (DNA strand breaks)

Os danos ao DNA mitocondrial foram avaliados através do ensaio de precipitação alcalina proposto por Olive (1998). Inicialmente foi preparada uma solução de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) a 2%, com 5g de SDS, EDTA (10 mM), Trizma base (10 mM) e NaOH (40 mM) diluídos em 250 mL de água Mili-Q, tal solução foi mantida no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida, foi preparada uma solução de KCl (0,12 M) com 0,22368g de KCl diluídos em 250 mL de água Mili-Q®. Após, foi preparada uma solução estoque de Trihidrocloroeto Trihidratado 10 mg.L^{-1} (Hoescht) diluídos em 900 μL de metanol. Em seguida, foi preparada uma solução tampão com NaCl (0,4 M), colato de sódio (4 mM) e Trizma-acetato (1 mM) diluídos em 50mL de água Mili-Q®. O pH desta solução foi ajustado para 8,5. Para o uso, foi preparada uma solução de trabalho com 10 μL da solução estoque de Hoescht diluídos em 9,990 mL da solução tampão.

Para a curva de calibração, foi preparada uma solução com esperma de salmão. Previamente foi elaborada uma solução tampão com Trizma base-HCl (10mM) e EDTA (1mM) diluídos em 100mL de água Mili-Q® (pH=8,0). Logo após, foram pesados 0,010g de esperma de salmão e diluídos em 10 mL da solução tampão. Para a preparação da curva de calibração, foram utilizadas as soluções de esperma de salmão, a solução tampão de homogeneização e a solução de Hoescht (Tabela 7).

Tabela 7. Valores da curva de calibração utilizada no ensaio de danos ao DNA

Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Sol. de Esperma de Salmão (μL)	Sol. Tampão de Homog. (μL)	Solução Hoescht (μL)
0	0	50	150
0,455	0,5	49,5	150
0,91	1	49	150
2,27	2,5	47,5	150
4,55	5	45	150
9,09	10	40	150
11,36	12,5	37,5	150
13,63	15	35	150

Neste ensaio, cada microtubo com 25 μL amostra de tecido previamente homogeneizada, recebeu 200 μL de SDS a 2% e foram agitados por inversão. Após 1 minuto em repouso, os microtubos receberam 200 μL da solução de KCl e foram agitados novamente por inversão. Em seguida, os microtubos permaneceram por 10 minutos em banho-maria a 60°C e após foram agitados por inversão. Após este processo, os microtubos foram incubados por 30 minutos a 4°C e em seguida, foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 4°C.

Para a preparação das placas, foram pipetados 50 μL do sobrenadante deste processo em placas pretas em duplicata e adicionados 150 μL da solução de Hoescht. Previamente a leitura, as placas já prontas foram submetidas a agitação, por 5 minutos a 700 rpm. A leitura foi realizada a 360nm de excitação e 450nm de emissão. Os resultados foram expressos em μg DNA strands mg^{-1} proteína total.

3.13. *Colinesterase (ChE)*

A atividade de ChE foi determinada através do método descrito por Ellman (1961) e adaptado por Guilhermino et al. (1996).

Inicialmente foram preparadas duas soluções, uma ácida e outra básica. A solução básica foi preparada com 6,9672g de K_2HPO_4 diluídos em 400 mL de água Mili-Q. A solução ácida foi preparada com 5,4436g de KH_2PO_4 diluídos em 400 mL de água Mili-Q. As duas soluções foram misturadas de maneira que o pH desta terceira solução alcançasse 7,5. Esta solução tampão de fosfato de potássio foi mantida na geladeira a 4°C e no escuro.

Em seguida, foi preparada uma solução de DTNB (0,75mM) com 0,0042g de DTNB diluídos em 500 μ L de metanol. No momento da preparação das placas, a solução de DTNB foi diluída em 13,5 mL da solução tampão de fosfato de potássio. Por último, uma solução de iodeto de acetilcolina (9mM) foi preparada com 0,0161 g desta substância diluídos em 6 mL da solução tampão de fosfato de potássio.

Para a montagem da placa, foram utilizados 20 μ L da amostra de tecido em duplicata, 130 μ L da solução de DTNB e 50 μ L da solução de iodeto de acetilcolina em placas transparentes. A leitura foi realizada imediatamente após a preparação das placas à 405nm de absorbância por 7 minutos. Os resultados foram expressos em nmol thiol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína total.

3.14. Análises dos Resultados

Para todas as respostas bioquímicas obtidas neste estudo, foi observada a normalidade dos dados obtidos através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Barlett. Através do teste de Grubb, os outliers foram identificados e suprimidos. Em seguida, as concentrações estatisticamente diferentes ao controle, em todos os ensaios, foram determinadas pelo teste de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Em todos os ensaios, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism v7.0.

Com o objetivo de evidenciar as alterações subcelulares causadas pelo crack no tecido mais responsivo dos mexilhões, as brânquias, foi realizada uma análise através da abordagem desenvolvida por Beliaeff & Burgeot (2002) e adaptada Guelert et al. (2010), conhecida como “Integrated Biomarker Responses” (IBR) (em português: Respostas Integradas ao Biomarcador). Serafim et al. (2012) e Maranhão et al. (2015) utilizaram previamente esta abordagem como uma ferramenta para interpretar

respostas de múltiplos biomarcadores e avaliar a susceptibilidade de organismos aquáticos à contaminantes. O índice foi calculado a partir da média de cada concentração dos biomarcadores analisados, em seguida foi calculado o logaritmo desses resultados. A partir do valor logaritmo, foi calculada a média e o desvio padrão de todas as concentrações juntas. Na sequência foi calculado o valor Z_i (o valor médio do logaritmo da concentração, subtraído da média de todas as concentrações, dividido pelo desvio padrão), por fim foi calculado o valor de $Z_i - Z_0$ (o valor de Z_i menos o valor do logaritmo da concentração testada). Tais resultados foram expressos em gráficos “starplot” do Excel®.

4. Resultados

4.1. Concentração de cocaína na alíquota de crack empregado.

As alíquotas de crack empregadas apresentaram 37,99 % de cocaína. As concentrações de cocaína inicial (T0) e após 24 horas (T24) foram analisadas para as soluções-teste do ensaio de TRCVN e biomarcadores. A taxa de degradação da cocaína contida no crack nas soluções dos aquários em 24h corresponde a 33,17%.

4.2. Respostas ao Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)

O ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro avaliou a citotoxicidade do crack através da estabilidade da membrana lisossômica nas células do mexilhão *Perna perna*. Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e o controle de solvente ($p < 0,05$). Observou-se diminuição do tempo de retenção do corante, especialmente após 96 e 168 horas de exposição (Figura 3).

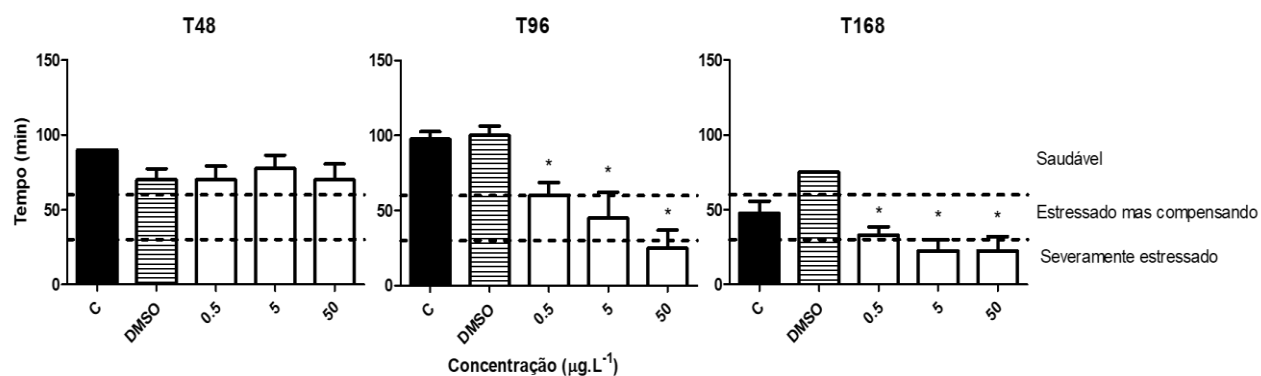


Figura 3. Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro após 48, 96 e 168 horas de exposição de *P. perna* a três concentrações diferentes de crack. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

Após 48 horas, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle de solvente. Depois de 96 horas de exposição, foram observadas diminuições significativas ($p < 0,05$) do tempo de retenção em todas as três concentrações testadas em comparação com o controle de solvente. Depois de 168 horas de exposição, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tempo de retenção do corante nas três concentrações testadas quando comparadas ao controle de solvente.

4.3. Análise da atividade relacionada a EROD

A atividade de EROD foi mensurada em brânquias e glândulas digestivas do mexilhão marinho *Perna perna*. Em brânquias, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controles. Após 96 horas de exposição, observou-se um aumento significativo na maior concentração, de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, em comparação com o controle de solvente (Figura 4).

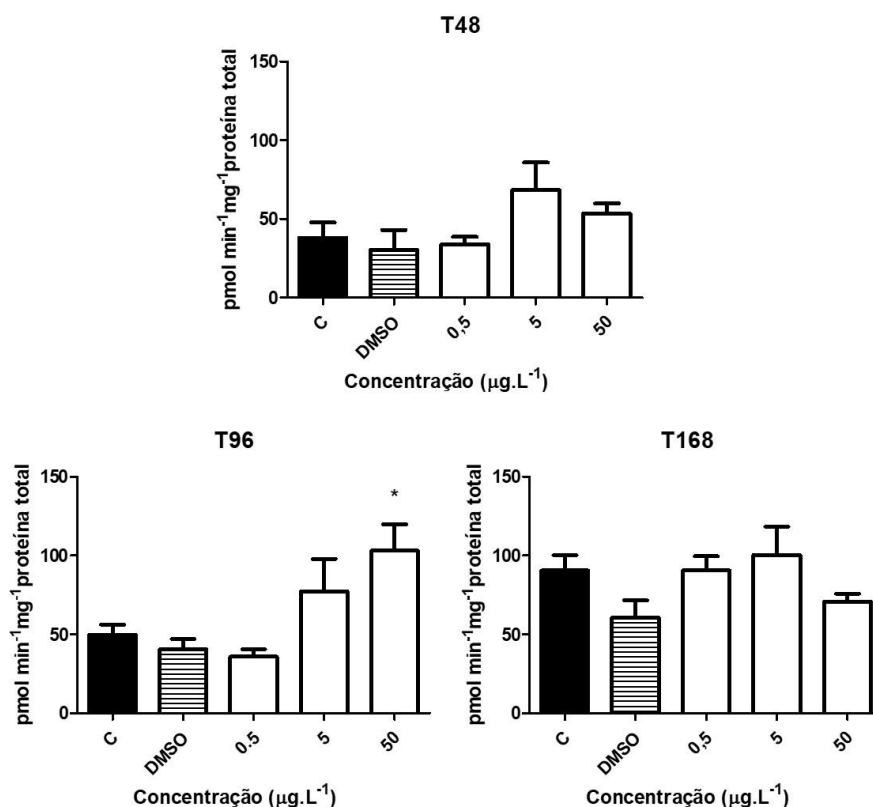


Figura 4. Atividade de EROD mensurada em brânquias do mexilhão *Perna perna*.

* Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

Em glândulas digestivas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle de solvente (Figura 5).

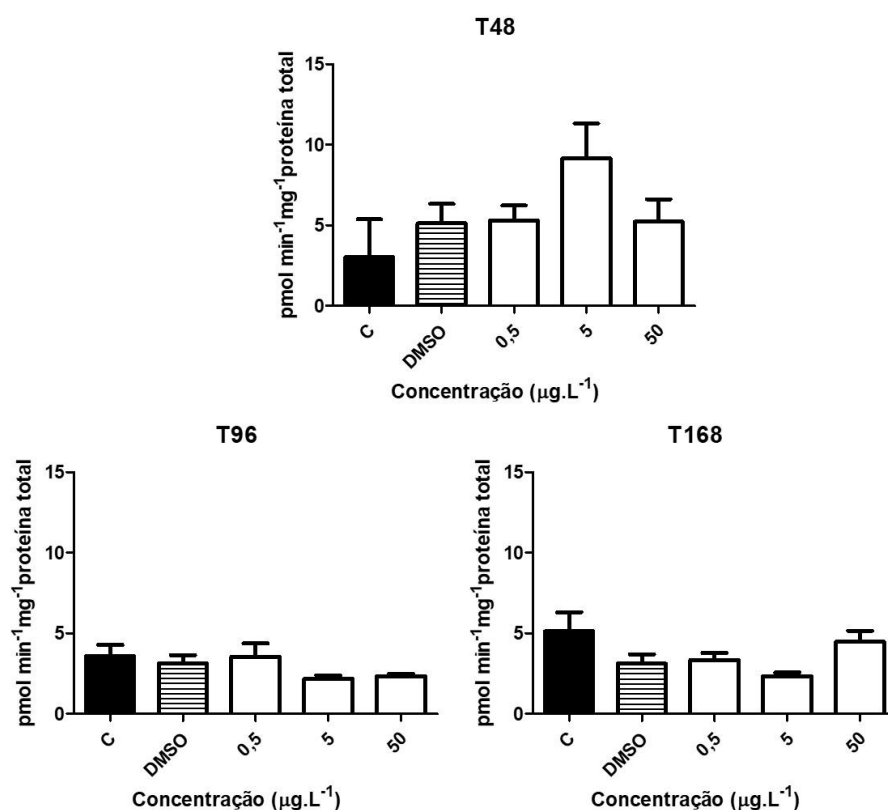


Figura 5. Atividade de EROD mensurada em glândula digestiva de *P. perna*.

4.4. Análise da atividade de DBF

A atividade de DBF foi mensurada em brânquias e glândulas digestivas do organismo-teste. Em brânquias, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controles. Após 48 horas de exposição, foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) da atividade de DBF nas duas maiores concentrações, 5 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao controle de solvente. Após 96 e 168 horas de exposição, nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada (Figura 6).

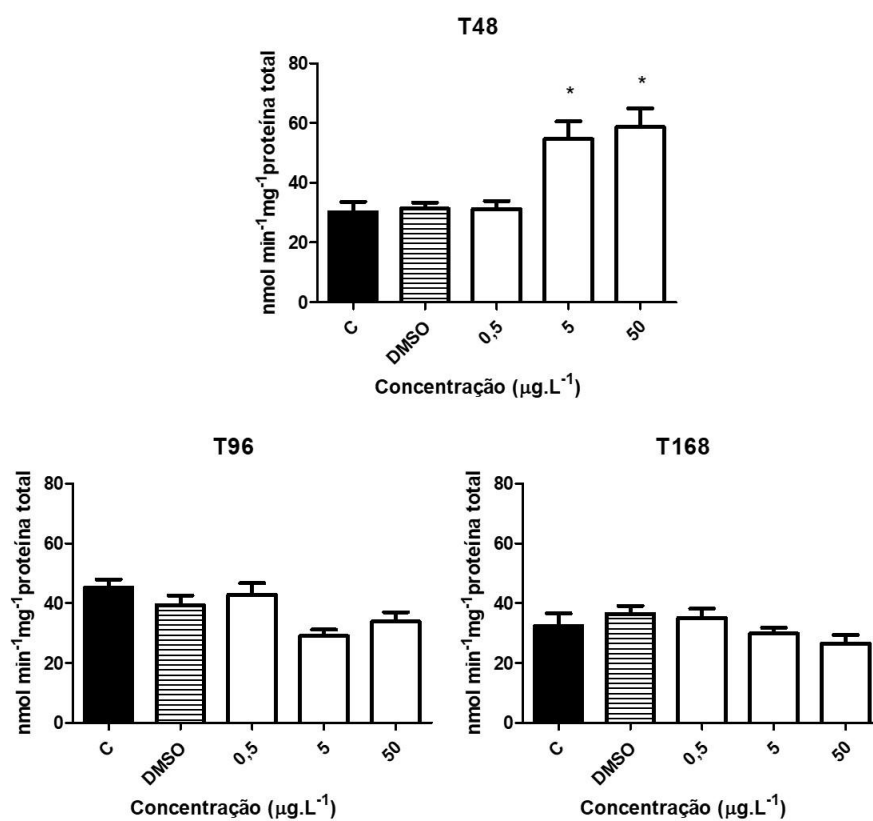


Figura 6. Atividade de DBF mensurada em brânquias do organismo-teste *Perna perna*. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

Em glândulas digestivas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em nenhum dos tempos analisados (Figura 7).

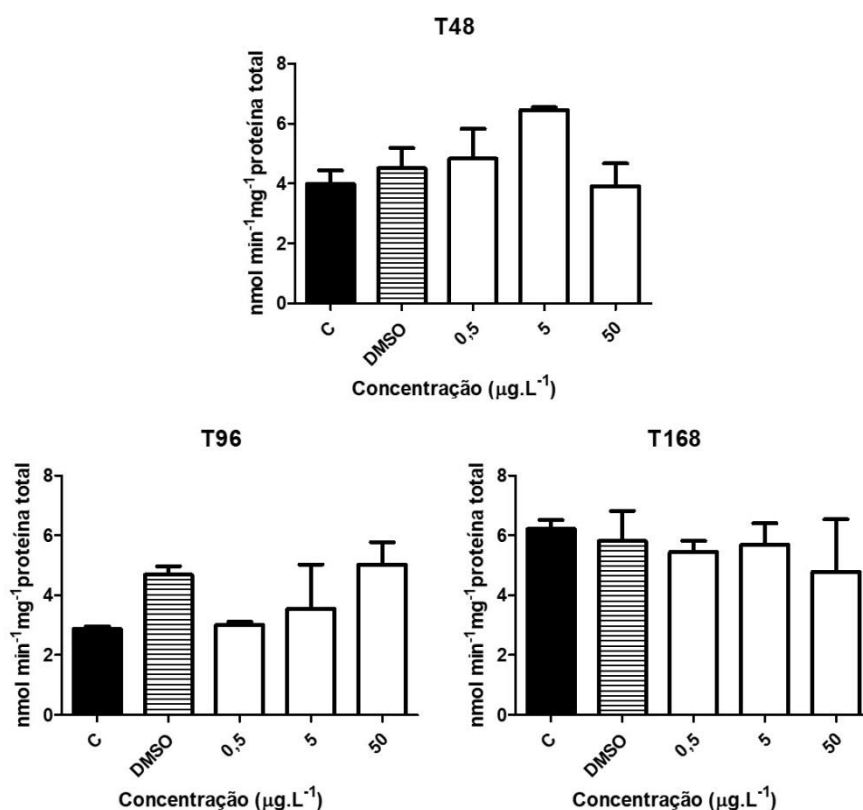


Figura 7. Atividade de DBF mensurada em glândulas digestivas de *P. perna*.

4.5. Análise da atividade relacionada ao GST

A atividade de GST foi analisada em brânquias e glândulas digestivas de *P. perna*. No tecido das brânquias, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controles utilizados. No tempo de 48 horas, foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) nas concentrações de 5 e 50 µg.L⁻¹ em comparação com o controle de solvente. Após 96 e 168 horas de exposição, as brânquias dos organismos testados não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle de solvente (Figura 8).

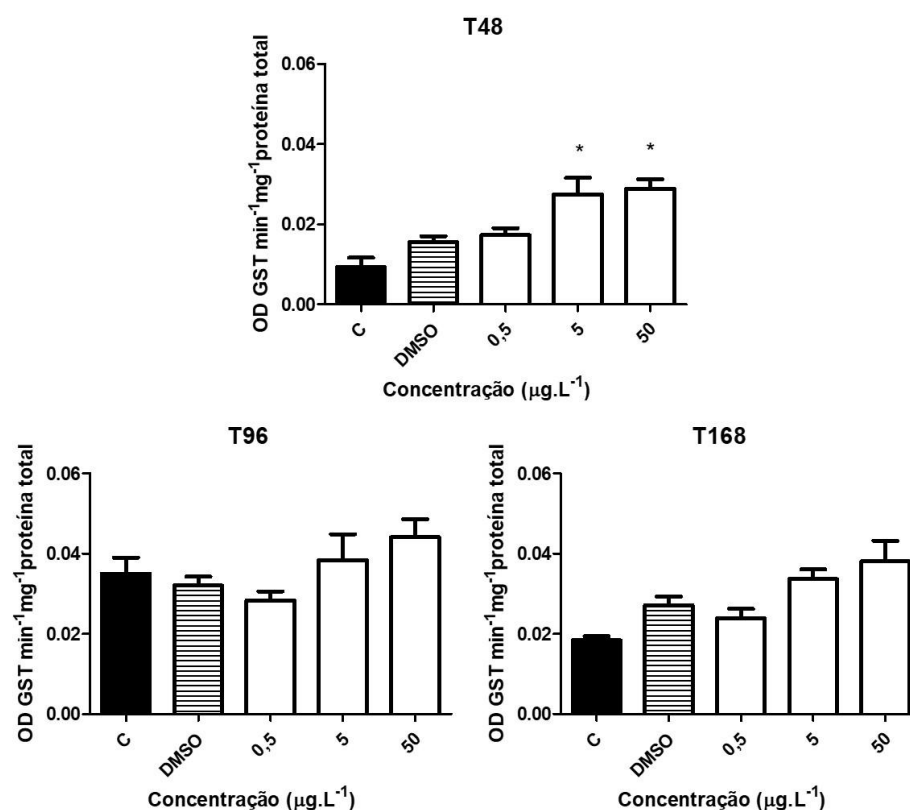


Figura 8. Atividade de GST mensurada em brânquias do mexilhão marinho. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

A atividade de GST mensurada em glândulas digestivas não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controles testados. Após 96 horas de exposição ao crack, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade relacionada a GST na maior concentração (50 µg.L⁻¹) em comparação com o controle de solvente (Figura 9).

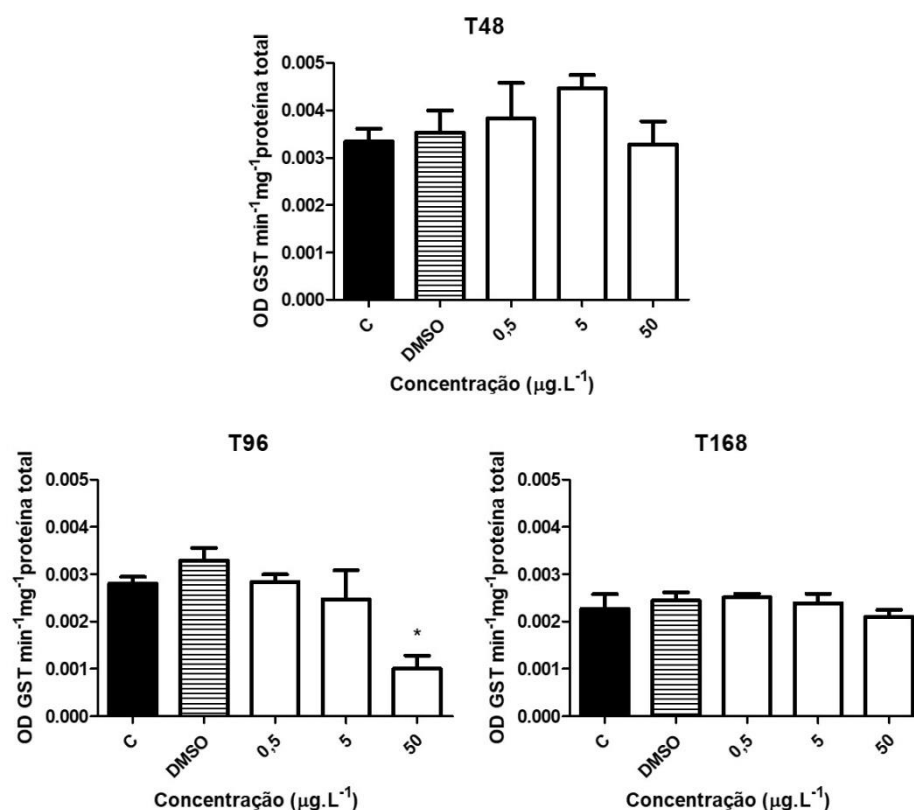


Figura 9. Atividade de GST mensurada em glândulas digestivas de *P. perna*. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

4.6. Análise da atividade relacionada a GPX

A atividade relacionada a GPX foi mensurada nos tecidos de brânquias e glândulas digestivas do mexilhão *P. perna*. Em nenhum dos dois tecidos foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois controles testados. Nas brânquias de organismos expostos ao crack, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de GPX após 48 horas de exposição, na concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ em comparação com o controle de solvente (Figura 10).

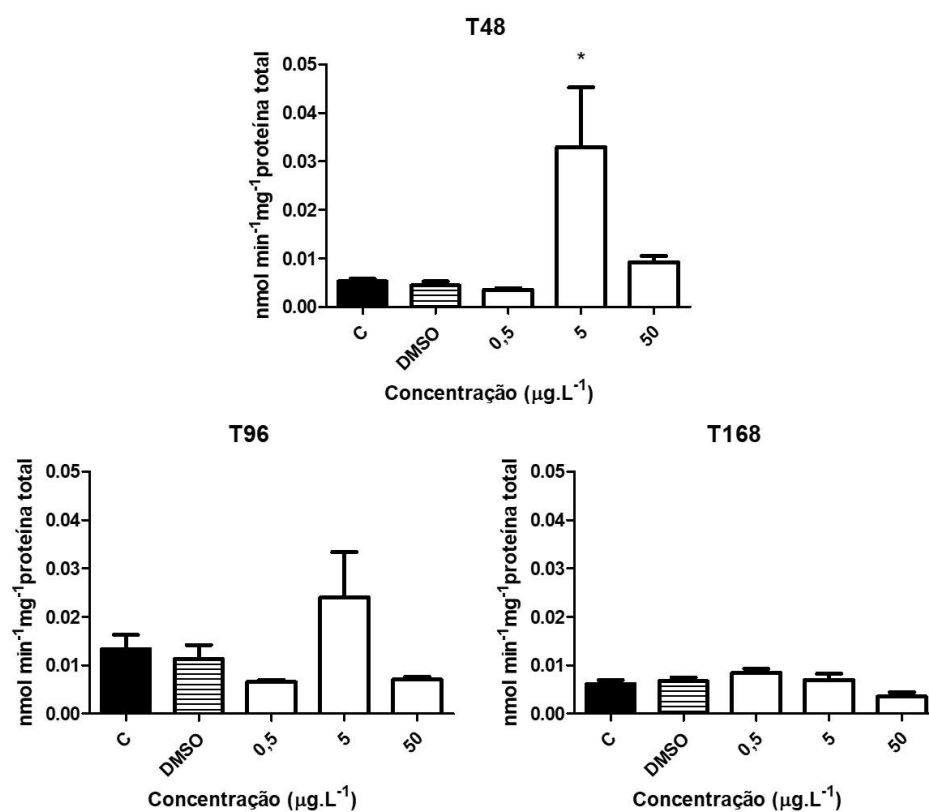


Figura 10. Atividade de GPX mensurada em brânquias de *P. perna*. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

Já no tecido de glândulas digestivas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 11).

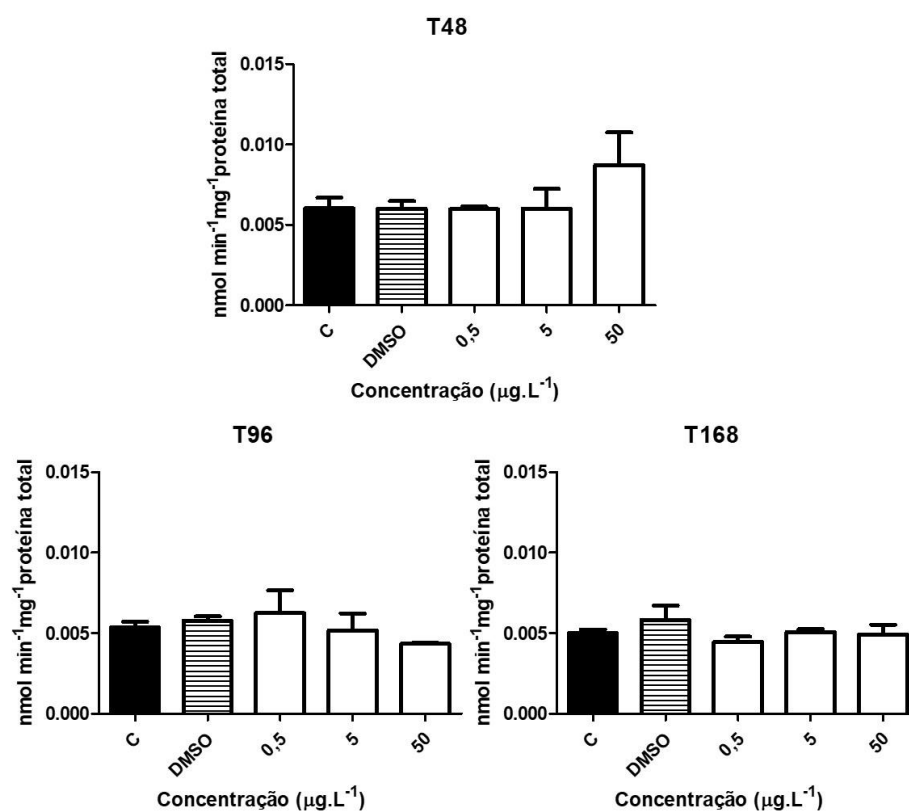


Figura 11. Atividade relacionada a GPX no tecido de glândulas digestivas de *Perna perna*.

4.7. Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi mensurada nos tecidos de brânquias e glândulas digestivas do organismo-teste. No tecido de brânquias não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles testados (Figura 12).

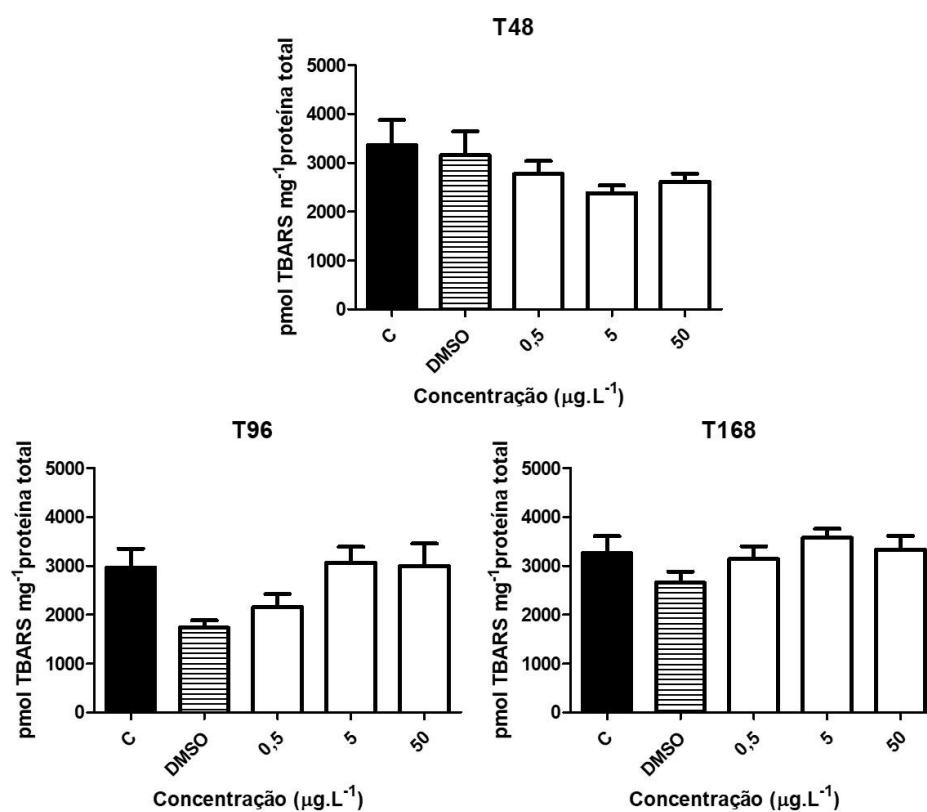


Figura 12. Peroxidação lipídica mensurada em brânquias de *Perna perna*.

Assim como não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) no tecido de brânquias do mexilhão marinho, também não foram encontradas tais diferenças no tecido de glândulas digestivas de *Perna perna* (Figura 13).

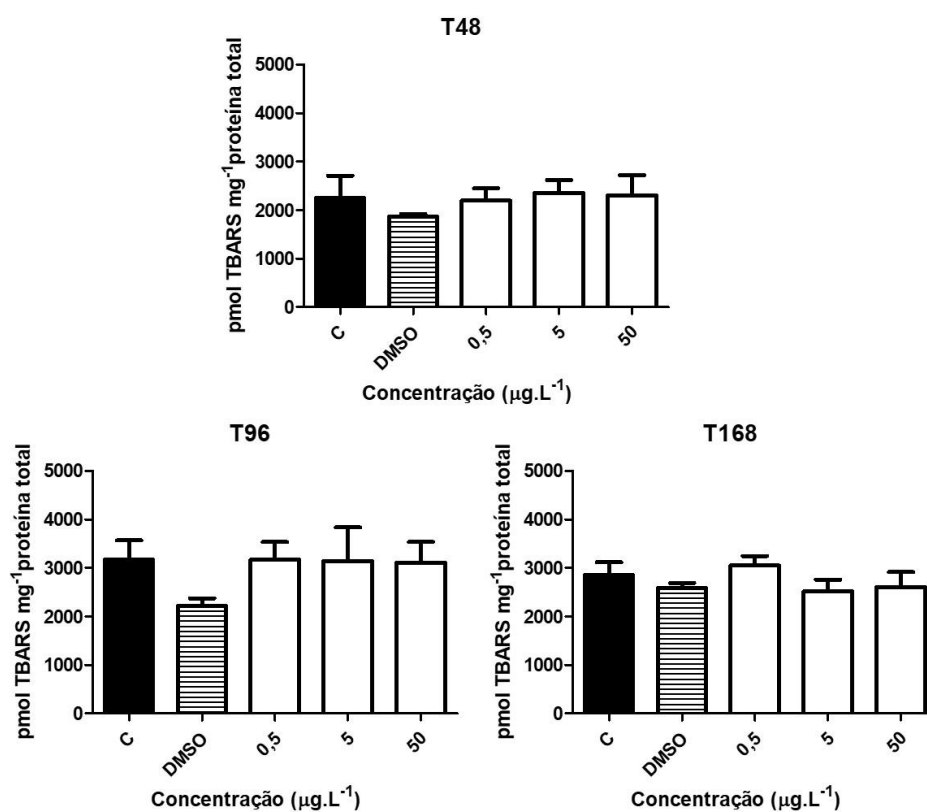


Figura 13. Peroxidação lipídica mensurada em glândulas digestivas do mexilhão marinho *Perna perna*.

4.8. Danos mensurados ao DNA mitocondrial

Os danos ao DNA mitocondrial foram mensurados em brânquias e glândulas digestivas do mexilhão marinho. Para o tecido de brânquias, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) dos danos ao DNA após 96 horas de exposição, na concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ em comparação com o controle de solvente (Figura 14).

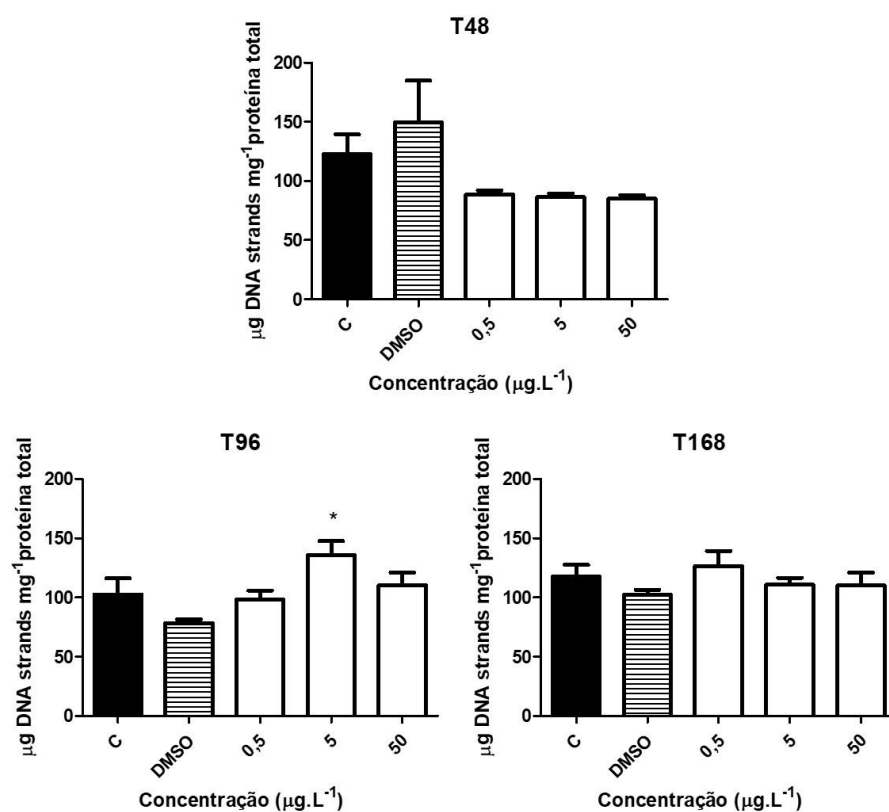


Figura 14. Danos ao DNA mitocondrial causados pela exposição ao crack no tecido de brânquias de *P. perna*. * Diferença significativa com o controle de solvente ($p < 0,05$).

No tecido de glândulas digestivas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) dos danos ao DNA em relação ao controle de solvente (Figura 15).

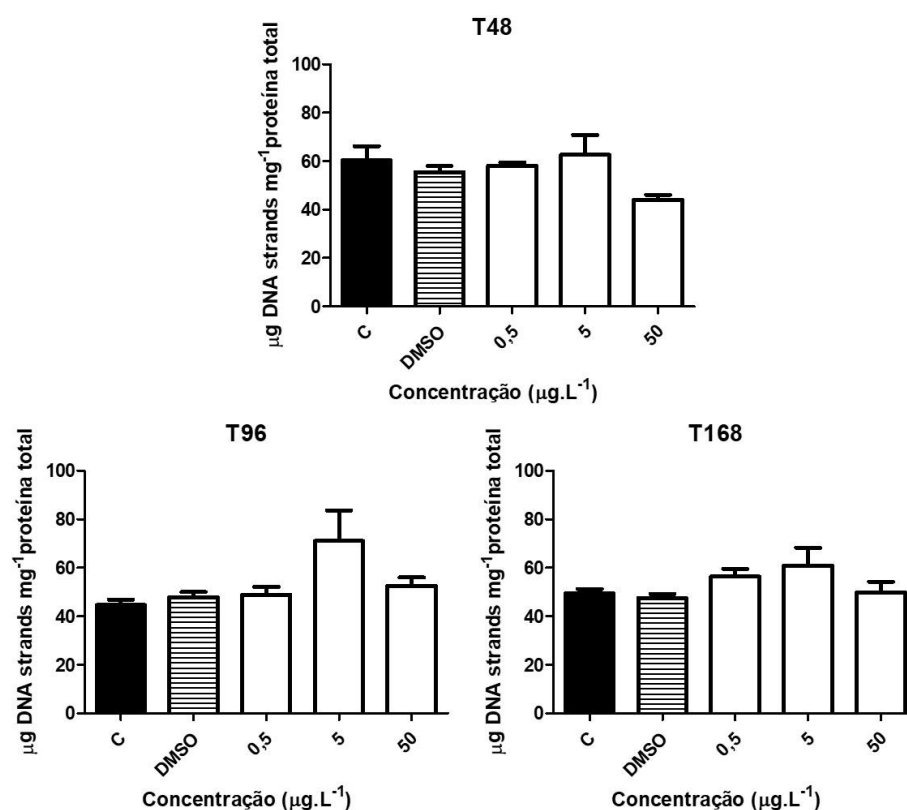


Figura 15. Danos ao DNA mitocondrial no tecido de glândulas digestivas do organismo-teste.

4.9. Neurotoxicidade (ChE) mensurada em *Perna perna*

Neurotoxicidade mensurada nos tecidos de brânquias, glândulas digestivas e músculo adutor do mexilhão marinho *P. perna*. No tecido de brânquias não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles testados (Figura 16).

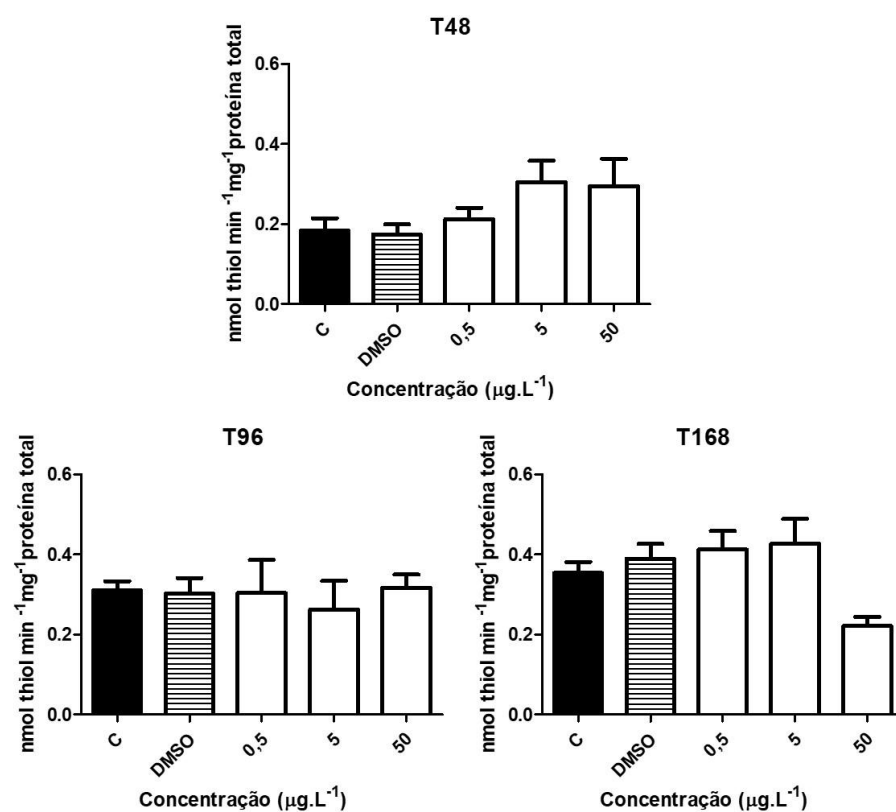


Figura 16. Neutoroxicidade mensurada nos tecidos de brânquias de *P. perna*.

Não foi observada neurotoxicidade no tecido de glândulas digestivas do mexilhão marinho (Figura 17).

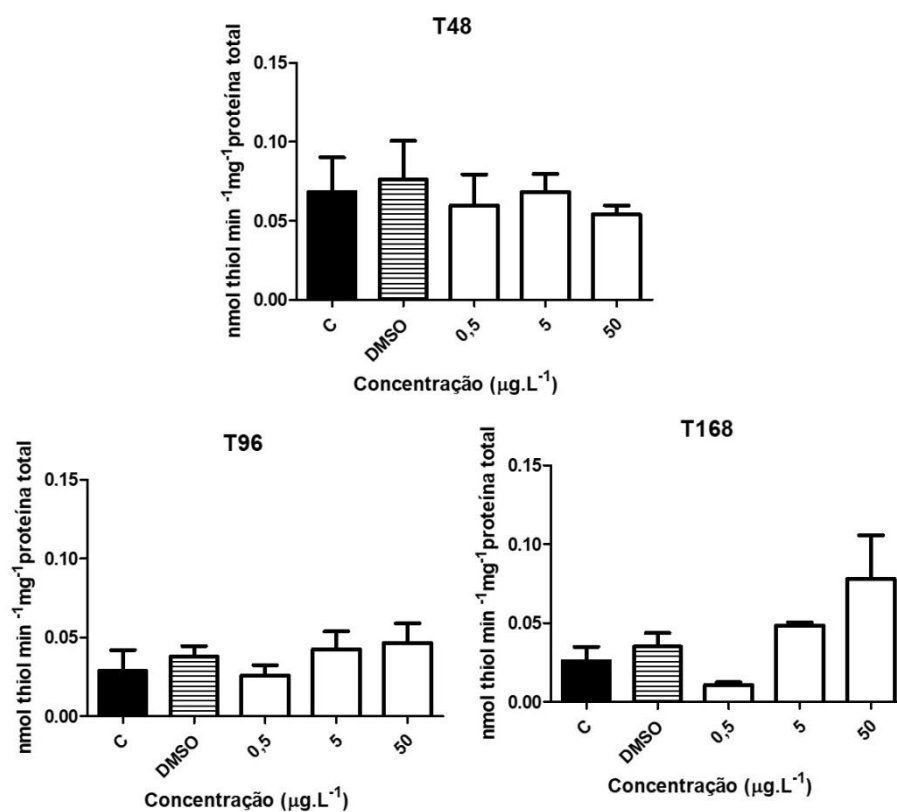


Figura 17. Neurotoxicidade em glândulas digestivas de *Perna perna*.

Assim como nos tecidos de brânquias e glândulas digestivas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no tecido de músculo adutor (Figura 18).

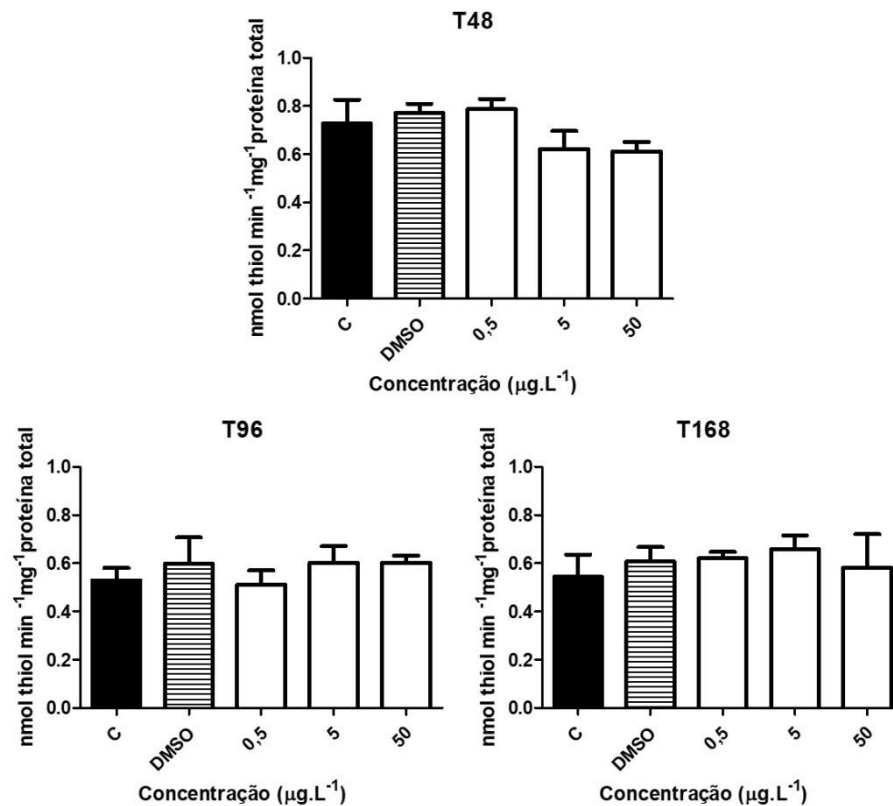


Figura 18. Neurotoxicidade no tecido de músculo adutor de *Perna perna*.

4.10. Índice IBR

O índice IBR foi calculado para todas as concentrações testadas nos diferentes tempos. As respostas de GST e GPx, além do ensaio TRCVN mostraram-se as mais relevantes, sendo observadas em todas as concentrações testadas e tempos de exposição (Figura 19).

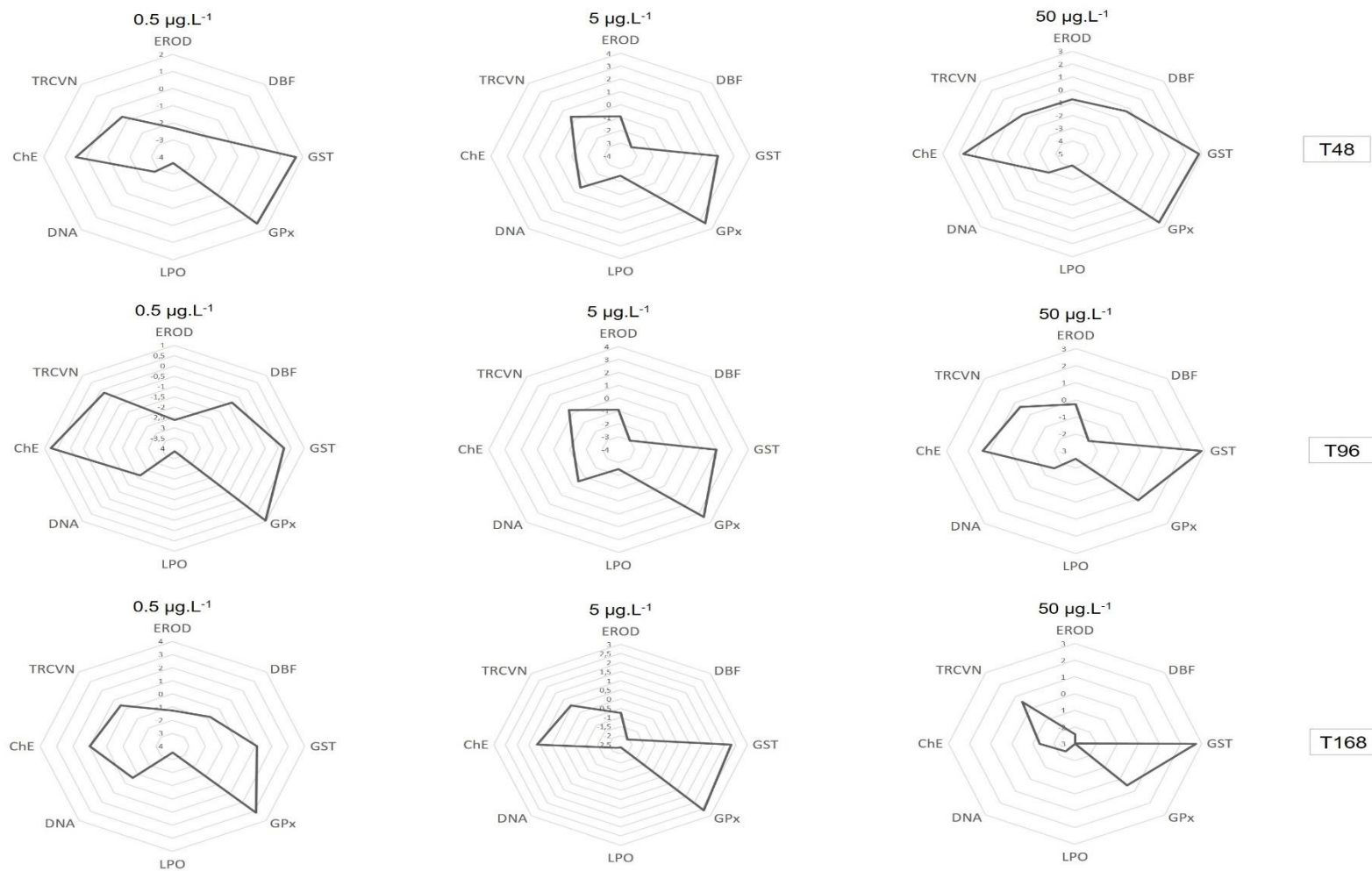


Figura 19. Índice IBR para brânquias do mexilhão *Perna perna* exposto ao crack (nas concentrações de 0,5, 5 e 50 µg.L⁻¹) em três diferentes tempos (48, 96 e 168h).

5. Discussão

Este estudo produziu os dados iniciais sobre os efeitos subletais do crack no mexilhão *Perna perna*. A atividade de enzimas da fase I de biotransformação foi observada somente no tecido de brânquias, assim como observado por Siebert et al. (2017) em brânquias de ostra *Crassostrea gigas* coletadas de uma área de cultivo no litoral catarinense. O aumento da atividade catalítica CYP450, mensurada através da EROD foi observada na maior concentração testada somente no tempo de 96 horas de exposição. Já a atividade CYP medida empregando a DBF apresentou aumento significativo nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após 48 de exposição. Estudos demonstram que a cocaína é indutora da atividade de CYP450 3A em ratos e humanos, principalmente em órgãos como fígado e rim (Valente et al., 2012; Kovacic, 2005; Pasanen et al., 1995).

A enzima com ação de conjugação GST, apresentou aumento em sua atividade após 48 e 168 horas de exposição nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no tecido de brânquias do mexilhão marinho e em glândulas digestivas, sua atividade foi diminuída apenas na concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após 48 horas de exposição. Já Parolini et al. (2013), em estudo com o mexilhão de água doce *D. polymorpha* expostos à benzoilecgonina, observaram aumento da atividade de GST na concentração de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após 14 dias de exposição e diminuição de sua atividade aos organismos expostos a concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após o 4º, 11º e 14º dias de exposição.

Já a atividade antioxidante de GPX, foi observada apenas em brânquias, com aumento de atividade após 48 horas de exposição, na concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em estudo recente, Zaparte et al. (2014) coletaram plasma de 30 pacientes internados usuários de crack no 4º e no 18º dias de abstenção da droga. No primeiro dia de coleta, foi observado maior dano oxidativo que no segundo dia de coleta, no qual foi observada uma recuperação ao estresse oxidativo e um aumento das defesas antioxidantes, indicado por altos níveis de atividade relacionada a GPX. Parolini et al. (2013) observaram aumento da atividade de GPX após 4 e 14 dias de exposição na concentração de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e diminuição de sua atividade após 11 e 14 dias de exposição a concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à benzoilecgonina.

A peroxidação lipídica (LPO) não foi observada em nenhum tecido analisado. Esse resultado está de acordo com o estudo de Sordi et al. (2014), que analisou

sangue de usuários de crack em um hospital psiquiátrico, na admissão e na alta desses pacientes e também não observaram peroxidação lipídica em relação ao controle. Porém, Parolini et al. (2013), observaram aumento da peroxidação lipídica nas células da hemolinfa de mexilhão-zebra (*D. polymorpha*) na concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de benzoilecgonina após 4, 7 e 14 dias de exposição.

Através do ensaio TRCVN, observou-se que a estabilidade da membrana lisossomal diminuiu significativamente após 96 horas de exposição em todas as concentrações testadas, apresentando diminuição no tempo de retenção do corante vermelho neutro. Maranhão et al. (2017), em estudo com *Perna perna*, observaram estresse significativo após 48 horas de exposição ao crack, nas concentrações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Binelli et al. (2012), ao testarem a cocaína no mexilhão *Dreissena polymorpha*, observaram uma correlação negativa entre o tempo de retenção do corante e as concentrações testadas, isto é, conforme a concentração de cocaína aumenta, o tempo de retenção do corante vermelho neutro diminui. Parolini et al. (2013) observaram que após 96 horas de exposição à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de benzoilecgonina a estabilidade da membrana lisossomal de *D. polymorpha* diminuiu. Diversos estudos demonstraram que a estabilidade da membrana lisossomal em regiões tropicais é diferente de regiões temperadas. Em regiões com temperaturas mais elevadas, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos tende a ser menor (Pereira et al., 2011). Baseado nessa premissa, este estudo produziu um índice para a saúde de mexilhões de regiões tropicais baseado em estudos com mexilhões coletados na costa brasileira (Abessa et al., 2005; Stefanoni & Abessa, 2008; Pereira et al., 2011; Cortez et al., 2012; Souza et al., 2016; Maranhão et al., 2017). Para tanto, os mexilhões foram considerados saudáveis quando o tempo de retenção do corante foi ≥ 60 minutos; estressados, porém compensando quando < 60 e ≥ 30 minutos e severamente estressados quando o tempo de retenção foi ≤ 30 minutos. Com base nesse índice, os organismos expostos ao crack foram considerados estressados, porém compensando após 96 horas de exposição (média TRCV = 43,3 min) e severamente estressados após 168 horas de exposição (média TRCV = 26 min).

Os danos ao DNA mitocondrial analisados neste estudo apresentaram efeitos em brânquias e glândulas digestivas, após 96 horas de exposição na concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Segundo Maranhão et al. (2017), a genotoxicidade no DNA mitocondrial de glândulas digestivas de mexilhão *Perna perna* expostas à concentração de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$

¹ de crack aumentou após 48 horas. Diversos estudos já comprovaram danos ao DNA nuclear através dos ensaios de micronúcleo e cometa de organismos expostos às drogas ilícitas. Oliveira et al. (2014) observaram os danos ao DNA através do ensaio do micronúcleo em células de mucosa oral de usuários de crack e constataram que o mesmo provoca rupturas cromossômicas e morte celular. O ensaio do micronúcleo avalia a quantidade de micronúcleos formados em células animais, os quais são gerados a partir da indução de agentes exógenos que causam ruptura cromossômica, resultando em fragmentos ou cromossomos inteiros no citosol destas células (Beliën et al., 1995 apud Oliveira et al., 2014). Porém, Yujra et al. (2015) não observaram aumento significativo na formação de micronúcleos em células de medula óssea e fígado de ratos nas concentrações de crack a 0,45, 9 e 18 mg.kg⁻¹. Já Moretti et al. (2016), em estudo com crack em ratos Wistar e as mesmas concentrações testadas por Yujra et al. (2015), observaram aumento significativo no número de micronúcleos em células de medula óssea expostas a maior concentração, de 18 mg.kg⁻¹, observaram também danos genéticos através do ensaio do cometa em células de fígado e sangue periférico nas concentrações de 9 e 18 mg/kg. Binelli et al (2012) também observaram aumento de micronúcleos em hemócitos do mexilhão *D. polymorpha* na concentração de 10 µg.L⁻¹ após 72 horas de exposição à cocaína. Parolini et al. (2013) observaram aumento aos danos ao DNA através do ensaio do cometa após 7 dias de exposição, nas duas concentrações testadas (0,5 e 1 µg.L⁻¹) e também aumento de células micronucleadas após 4 dias na concentração de 1 µg.L⁻¹.

As concentrações de efeito observadas de efeito citogenotóxico (TRCVN e danos ao DNA mitocondrial), juntamente com os valores encontrados por Binelli et al. (2012) e Parolini et al. (2013), foram próximas às concentrações ambientais, uma vez que as concentrações de cocaína no crack utilizado neste trabalho foram em torno de 40%, ou seja, 0,2 µg.L⁻¹ para o TRCVN e 2 µg.L⁻¹ para os danos ao DNA. Tais dados sugerem risco ambiental aos ecossistemas aquáticos, uma vez que a cocaína foi observada no ambiente em concentrações de 0,2 a 5,9 µg.L⁻¹.

Através do índice IBR foi possível observar que a atividade CYP-like, seguida por GST e GPx foram ativadas nas brânquias e foram eficientes no combate à peroxidação lipídica (LPO) em todas as concentrações/tempos de exposição. Porém, foram observados danos na estabilidade da membrana lisossomal (TRCVN) e ao DNA

mitocondrial após 96 horas de exposição. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado em estudos anteriores envolvendo bivalves marinhos e dulcícolas (Maranho et al., 2017; Binelli et al., 2012), embriões de *Danio rerio* (Parolini et al., 2017), hamsters (Yu et al., 1999), e ratos (Díez-Fernandez et al., 1999) que demonstram que a cocaína e seus subprodutos (incluindo o crack) promovem efeitos citogenotóxicos pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, causada pela biotransformação da cocaína através da atividade de CYP450, promovendo desta forma danos ao DNA e processos de apoptose.

6. Considerações Finais

O mexilhão *P. perna* foi considerado um modelo adequado para avaliar a toxicidade do crack e seu risco aos ecossistemas marinhos. Os resultados demonstraram que as brânquias do mexilhão marinho foram o tecido mais responsivo, com atividades de detoxificação (CYP e GST) e antioxidante (GPx) mais evidentes após 48 e 96 horas de exposição. Apesar de observar as atividades anteriormente citadas, o metabolismo do mexilhão não foi capaz de prevenir danos ao DNA mitocondrial. Respostas dose- e tempo-dependentes foram observadas através da análise da estabilidade da membrana lisossomal (TRCVN). Este estudo demonstrou que a introdução contínua de drogas ilícitas em ecossistemas costeiros deve ser considerada uma ameaça a organismos marinhos, salientando a necessidade de pesquisas relacionadas à bioacumulação de drogas ilícitas em organismos marinhos e revisão da legislação ambiental vigente que atualmente não inclui tais contaminantes.

Referências Bibliográficas

- Abessa, D.M.S., Zaroni, L.P., Sousa, E.C.P.M., Gasparro, M.R., Pereira, C.D.S., Rachid, B.R.F., Depledge, M., King, R.S. **Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil.** Brazil Arch 48 (2), 217–225. 2005
- Almeida, E.A., Marques, S.A., Klitzke, C.F., Bainy, A.C.D., Gennari, M.H., Di Mascio, P., Loureiro, A.P.M. **DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*.** Comp Biochem Physiol - part c, 135: 295-303. 2003
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B. **Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments.** Sci Total Environ 454-455, 442–56. 2013.
- Baker, D.R., Očenášková, V., Kvicálová, M., Kasprzyk-Hordern, B. **Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter - further developments in sewage epidemiology.** Environ Int 48, 28–38. 2012.
- Beliaeff B., Burgeout T. **Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment.** Environmental Toxicology Chemistry 21, 1316-1322. 2002.
- Beliën, J.A.M., Copper, M.P., Braakhuis, B.J.M., Snow, G.B., Baak, J.P.A. **Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells.** Carcinogenesis 116: 2395–2400. 1995.
- Benowitz, N.L. **Clinical Pharmacology and Toxicology of Cocaine.** Pharmacol Toxicol 72, 3-12. 1993.
- Binelli, A., Pedriali, A., Riva, C., Parolini, M. **Illicit drugs as new environmental pollutants: Cyto-genotoxic effects of cocaine on the biological model *Dreissena polymorpha*.** Chemosphere 86 (9), 906–911. 2012.
- Bradford M.B. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 72, 248-254. 1976.
- Bonnes-Taourel, D., Guérin, M. C., Torreilles, J. **Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation?** Biochem Pharmacol 44 (5), 985–988. 1992.
- Borova, V.L., Maragou, N.C., Gago-Ferrero, P., Pistos, C., Thomaidis, N.S. **Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Anal Bioanal Chem 406 (17), 4273–85. 2014.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. **The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.** Sci Total Environ 247, 295-311. 2000.

Campestrini, I., Jardim, W.F. **Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil.** Sci Total Environ, 576, 374–380. 2017.

Carlini E.A., Nappo S.A., Galduróz J.C.F., Noto A.R. **Drogas psicotrópicas: o que são e como agem.** Revista IMESC (3):9-35. 2001.

Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R. **Illicit drugs in the environment: occurrence, analysis, and fate using mass spectrometry.** Oxford: Wiley-Blackwell. 2011.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S. **Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*.** Aquat Toxicol 52 (3–4), 189–203. 2001.

Collins, A.R., Ma, A.G., Duthie, S.J. **The kinetics of repair of oxidative DNA-damage (Strand breaks and oxidized pyrimidines) in human-cells.** Mut Res DNA Repair, 336 (1), 69–77. 1995.

Cortez F.S., Pereira C.D.S., Santos A.R., Cesar A., Choueri R.B., Martini G.D.A., Bohrer-Morel M.B. **Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758).** Environ Pollut 168:145–150. 2012

Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K. **Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring.** Mar Environ Res 56 (4), 443–470. 2003.

Díez-Fernández C., Zaragoza A., Alvarez A.M., Cascales M. **Cocaine cytotoxicity in hepatocyte cultures from phenobarbital-induced rats: involvement of reactive oxygen species and expression of antioxidant defense systems.** Biochemical Pharmacology 58: 797-805. 1999.

Domingues, I., Agra, A. R., Monaghan, K., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A. **Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination.** Environ Toxicol Chem 29 (1), 5–18. 2010.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr, Featherstone, R.M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** Biochem Pharmacol 7, 88–95. 1961.

Florence, A.T., Attwood, D. Chapter 3. **Physicochemical properties of drugs in solution.** Pages 77-82. In: Physicochemical principles of pharmacy. 4th ed. Ed. Pharmaceutical Press. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 479p. 2006.

Gagné, F., Blaise, C. **Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents.** Water Res 27:1669–1682. 1993.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C. **Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on**

freshwater mussels (*Elliptio complanata*). Comp Biochem Phys 145: 542 – 552. 2007a.

Gagné, F., Blaise, C., André, C., Gagnon, C., Salazar, M. **Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment.** Chemosphere 68 (4), 731–743. 2007b.

Garcia, L. M., Castro, B., Ribeiro, R., Guilhermino, L. **Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants.** Biomarkers 5 (4), 274–284. 2000.

Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., Fava, F. **Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation.** New Biotechnology. 32(1), 147-156. 2015.

Gay, F., Ferrandino, I., Monaco, A., Cerulo, M., Capasso, G., Capaldo, A. **Histological and hormonal changes in the European eel (*Anguilla anguilla*) after exposure to environmental cocaine concentration.** J Fish Dis 39 (3), 295–308. 2016.

Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P. **Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450.** Critical Rev Toxicol 25 (1), 25–65. 1995.

Ghosheh, F.R., Ehlers, J.P., Ayres, B.D., Hammersmith, K.M., Rapuano, C.J., Cohen, E.J. **Corneal ulcers associated with aerosolized crack cocaine use.** Clinical Sci 26 (8), 966–969. 2007.

Guerlet E., Vasseur P., Giambérini L. **Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel.** Ecotoxicology and Environmental Safety 73 (6): 1170-1181. 2010.

Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M., **Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*.** Chemosphere 32 (4), 727–738. 1996.

Gutteridge, J.M.C. **Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.** Clinical Chem 41, 1819–1828. 1995.

Haim, D.Y., Lippmann, M.L., Goldberg, S.K., Walkenstein, M.D. **The pulmonary complications of crack cocaine: A comprehensive review.** Chest 107 (1), 233–240. 1995.

Hernández, F., Ibáñez, M., Botero-Coy, A.M., Bade, R., Bustos-López, M.C., Rincón, J., Moncayo, A., Bijlsma, L. **LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia.** Anal Bioanal Chem (21): 6405-16. 2015.

Hoff, A.L., Riordan, H., Morris, L., Cestaro, V., Wieneke, M., Alpert, R., Wang, G., Volkow, N. **Effects of crack cocaine on neurocognitive function.** Psych Res 60, 167–176. 1996.

King, R. **Rapid assessment of marine pollution – Biological techniques.** Plymouth Environmental Research Center, University of Plymouth, UK, 37p. 2000.

Kovacic, P. **Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer.** *Med Hypoth*, 64 (2), 350–356. 2005.

Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. **Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary.** *Environ Int* 54, 92–99. 2013.

Laranjeira, R., Madruga, C.S., Pinsky, I., Caetano, R., Ribeiro, M., Mitsuhiro, S. **II Levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD II) - Consumo de Álcool no Brasil: Tendências entre 2006/ 2012.** INPAD, São Paulo. 2013.

Lai, F.Y., O'Brien, J.W., Thai, P.K., Hall, W., Chan, G., Bruno, R., Ort, C., Prichard, J., Carter, S., Anuj, S., Kirkbride, K.P., Gartner, C., Humphries, M., Mueller, J.F. **Cocaine, MDMA and methamphetamine residues in wastewater: Consumption trends (2009-2015) in South East Queensland, Australia.** *Sci Total Environ* 568, 803–809. 2016.

López-Patiño, M.A., Yu, L., Cabral, H., Zhdanova, I.V. **Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish.** *Physiol Behav* 93, 160–171. 2008.

Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H. **Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study.** *Mar Ecol Prog Series* 129: 189-196. 1995.

Mamaca, E., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Aas, E., Bjørnstad, A., Baussant, T., Floch, S. Le. **The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene.** *Aquat Toxicol* 75 (3), 191–201. 2005.

Maranho, L.A., Fontes, M.K., Kamimura, A.S.S., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Pusceddu, F.H., Cortez, F.S., Lebre, D.T., Marques, J.R., Abessa, D.M.S., Ribeiro, D.A., Pereira, C.D.S. **Exposure to crack cocaine causes adverse effects on marine mussels *Perna perna*.** *Mar Pollut Bull* 123(1-2), 410-414. 2017.

Maranho L.A., André C., DelValls T.A., Gagné F., Martín-Díaz M.L. **Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: Energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 118: 27-36. 2015.

Maranho, L.A., Pereira, C.D.S., Choueri, R.B., Cesar, A., Gusso-Choueri, P.K., Torres, R.J., Abessa, D.M.S, Morais, R.D., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L. **The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys.** *JEnviron Monit* 14 (10), 2608–15. 2012.

Mari, F., Politi, L., Biggeri, A., Accetta, G., Trignano, C., Di Padua, M., Bertol, E. **Cocaine and heroin in waste water plants: A 1-year study in the city of Florence, Italy.** *Forensic Science International*, 189, 88–92. 2009.

Mehanny, S. Z., & Abdel-Rahman, M. S.. **Cocaine hepatotoxicity in mice: histologic and enzymatic studies.** *Toxicol Pathol*, 19(1), 24–29. 1991

Metcalfe, C., Tindale, K., Li, H., Rodayan, A., Yargeau, V. **Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use.** *Environmental Pollution*, 158, 3179–3185. 2010.

- McFarland, V.A., Inouye, S.L., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D. **Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*.** Arch Environ Contam Tox 37, 236-241. 1999.
- Moretti, E. G., Yujra, V. Q., Claudio, S. R., Silva, M. J. D., Vilegas, W., Pereira, C. D. S., de Oliveira, F., Ribeiro, D. A. **Acute crack cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats.** *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 8104–8112. 2016.
- Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S. **Anatomia Funcional de *Perna perna* (Linné) (*Bilvalvia*, *Mytilidae*).** Revta bras. Zool. 14(1): 135-168. 1997.
- Nefau, T., Karolak, S., Castillo, L., Boireau, V., Levi, Y. **Presence of illicit drugs and metabolites in influents and effluents of 25 sewage water treatment plants and map of drug consumption in France.** *Science of the Total Environment*, 461–462, 712–722. 2013.
- Nestler, E. J. **Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(4), 210–218. 2004.
- Olive, P. L. **DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 11(4), 487-495. 1988.
- Oliveira, M.G.A., dos Santos, J.N., Cury, P.R., da Silva, V.H.P., Oliveira, N.R.C., Padovani, R.C., Tucci, A.M., Ribeiro, D.A. **Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells of crack cocaine users.** *Environ Sci Pollut Res* 21 (8), 5760–5764. 2014.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K.P., Naidu, R. **Illicit drugs and the environment – a review.** *Sci Total Environ*, 463-464, 1079-92. 2013.
- Parolini M., Ghilardi A., Della Torre C., Magni S., Prosperi L., Calvagno M., Del Giacco L., Binelli A. **Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells.** *Environmental Pollution* 226: 504–514. 2017.
- Parolini, M., Pedriali, A., Riva, C., Binelli, A. **Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*.** *Science of the Total Environment*, 444, 43–50. 2013.
- Pasanen, M., Pellinen, P., Stenbäck, F., Juvonen, R. O., Raunio, H., & Pelkonen, O. **The role of CYP enzymes in cocaine-induced liver damage.** *Archives of Toxicology*, 69, 287–290. 1995.
- Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L. **Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone.** *Science of the Total Environment* 548, 148-154. 2016.
- Pereira, C.D.S., Mazur, W., Fontes, M.K., Cardoso, B.G., Souza N., Gaspar, J., Pusceddu, F.H., Cortez, F.S., Guimarães, L. **Avaliação do risco ambiental de compostos farmacêuticos na baía de Santos.** Resumo. Apresentação oral. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Guarapari, ES. 2014.

Pereira, C.D.S., Martín-Díaz, M.L., Catharino, M.G.M., Cesar, A., Choueri, R.B., Taniguchi, S., Abessa, D.M.S., Bicego, M.C., Vasconcellos, M.B.A., Bainy, A.C.D., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A. **Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels — a seasonal monitoring.** *Environ Tox* 27 (5), 257–267. 2012.

Pereira, C.D.S., Martín-Díaz, M.L., Zanette, J., Cesar, A., Choueri, R.B., Abessa, D.M.S., Catharino, M.G.M., Vasconcellos, M.B.A., Bainy, A.C.D., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A. **Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil).** *Ecotox Environ Saf* 74 (5), 1257–64. 2011.

Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.S., Bainy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., Sousa, E.C.P.M. **Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil.** *Environ Tox Chem* 26, 462–469. 2007.

Postigo, C., López de Alda, M. J., Barceló, D. **Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation.** *Environment International*, 36(1), 75–84. 2010.

Pulcherio, G., Stolf, A. R., Fensterseifer, D. P., Kessler, F. **Crack – da pedra ao tratamento.** *Revista Da AMRIGS*, 54(3), 337–343. 2010.

Resgalla JR., C.R., Weber, L.I., e Conceição, M.B. **O mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações.** Rio de Janeiro: Interciência. 324p. 2008.

Ribeiro, M., Dunn, J., Sesso, R., Dias, a. C., Laranjeira, R. **Causes of death among crack cocaine users.** *Rev.Bras.Psiquiatr.*, 28(3), 196–202. 2006.

Serafim A., Company R., Lopes B., Fonseca V.F., França S., Vasconcelos R.P., Bebianno M.J., Cabral H.N. **Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems.** *Ecological Indicators* 19: 215–225. 2012.

Siebert, M.N., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Lima, D., Gomes, C.H.A.M., Melo, C.M.R., Bainy, A.C.D. **Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 203: 115–121. 2017.

Souza A., Moreno B.B., Almeida J.E., Rogero S.O., Pereira C.D.S., Rogero J.R. **Cytotoxicity evaluation of Amoxicillin and Potassium Clavulanate in *Perna perna* mussels.** *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 11(1): 21–26. 2016

Stefanoni M.F., Abessa D.M.S. **Physiological Responses of the Brown Mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) Exposed to the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS).** *Holos Environmental* 11 (1): 44–53. 2008

Sordi, A. O., Pechansky, F., Kessler, F. H. P., Kapczinski, F., Pfaffenseller, B., Gubert, C., de Aguiar, B.W., Narvaez, J.C.M., Ornell, F., von Diemen, L. **Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal.** *Psychopharmacology*, 231(20), 4031–4039. 2014.

Thomas, K. V., Araújo da Silva, F. M., Langford, K. H., de Souza, A. D. L., Nizzeto, L., Waichman, A. V. **Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil.** *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), 302–308. 2014.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), **World Drug Report 2016.** United Nations publication, Sales No. E.16.XI.7

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), **World Drug Report 2014.** United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7.

Valente, M. J., Carvalho, F., Bastos, M. d L., de Pinho, P. G., Carvalho, M. **Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage.** *Current Medicinal Chemistry*, 19(33), 5601–6. 2012.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** *Environ Toxicol Pharm* 13 (2): 57–149. 2003.

van Nuijs, A. L. N., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., Jorens, P. G., Bervoets, L., Blust, R., Neels, H., Covaci, A. **Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment.** *Water Research*, 43(5), 1341–1349. 2009.

Yu C.T.R., Lee T.C., Wang T.C., Li J.H. **Genetic toxicity of cocaine.** *Carcinogenesis* 20: 1193-1199. 1999.


Yujra, V. Q., Moretti, E. G., Claudio, S. R., Silva, M. J. D., Oliveira, F. de, Oshima, C. T. F., Ribeiro, D. A. **Genotoxicity and mutagenicity induced by acute crack cocaine exposure in mice.** *Drug and Chemical Toxicology*, 39(4), 388–391. 2016.

Wills, E. D., **Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes, in: Snell, K., Mullock, B. (eds.), Biochemical toxicology: a practical approach.** IRL Press, USA, 127-150. 1987.

Zaparte, A., Viola, T. W., Grassi-Oliveira, R., Da Silva Morrone, M., Moreira, J. C., Bauer, M. E. **Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences.** *Psychopharmacology*, 232(8), 1405–1413. 2015.

Zhang, J. Y., Foltz, R. L. **Cocaine metabolism in man: Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine.** *J Analyt Toxicol* 14 (4), 201–205. 1990.

Anexo I

 **TRIBUNAL DE JUSTIÇA DO ESTADO DE SÃO PAULO**
COMARCA DE LIMEIRA
FORO DE LIMEIRA
2ª VARA CRIMINAL
Rua Boa Morte, 661, ., centro - CEP 13480-181, Fone: 19 3442-5000,
Limeira-SP - E-mail: limeira2cr@tjsp.jus.br

OFÍCIO

Processo nº: 3012156-28.2013.8.26.0320 Ordem nº 1122/2013
Classe – Assunto:
Representante: **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP) - CAMPUS BAIXADA SANTISTA**
(FAVOR MENCIONAR ESTAS REFERÊNCIAS NA RESPOSTA)

O(A) MM. Juiz(a) de Direito da 2ª Vara Criminal do Foro de Limeira, Dr(a). Luiz Augusto Barrichello Neto, pelo presente, expedido nos autos da ação em epígrafe, comunica à Vossa Senhoria que foi deferido o pedido para liberação de 50 gramas de crack para realização de pesquisa científica, ficando consignado que o transporte da substância entorpecente ficará ao encargo da Universidade Federal de São Paulo, através de pessoa responsável que deverá apresentar-se documentalmente à Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes de Limeira.

Após a realização dos estudos, a substância deverá ser totalmente inutilizada, com acompanhamento da Vigilância Sanitária, encaminhando-se cópia do relatório à este Juízo, tudo conforme cópias integrais dos autos que seguem em anexo, referentes a parte abaixo qualificado(a)(s):

Representante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP) - CAMPUS BAIXADA SANTISTA, SILVA JARDIM, 136, Santos-SP, Brasileiro

Atenciosamente.

Limeira, 18 de outubro de 2013.

DOCUMENTO ASSINADO DIGITALMENTE NOS TERMOS DA LEI 11.419/2006, CONFORME IMPRESSÃO À MARGEM DIREITA

Ao Ilmo Sr. Reitor da
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Rua Silva Jardim, 136 - Santos
SANTOS/SP – CEP 11015-020

Prof. Daniel Araki Ribeiro

Este documento é cópia do original assinado digitalmente por PAULO ROBERTO SARTORI. Para acessar os autos processuais, acesse o site www.tjsp.jus.br, informe o processo 3012156-28.2013.8.26.0320 e o código 8W0000000KLGN.

Anexo II

Author's personal copy

Environmental Science and Pollution Research
https://doi.org/10.1007/s11356-018-1600-7

GLOBAL TOXICITY ASSESSMENT: CHEMICALS, ENVIRONMENTAL SAMPLES, AND ANALYTICAL METHODS



Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel *Perna perna*

Andressa dos Santos Barbosa Ortega¹ · Luciane Alves Maranhão^{1,2} · Caio Rodrigues Nobre³ · Beatriz Barbosa Moreno¹ · Rafael Solé Guimarães¹ · Daniel Temponi Lebre⁴ · Denis Moledo de Souza Abessa³ · Daniel Araki Ribeiro⁵ · Camilo Dias Seabra Pereira^{1,2}

Received: 15 November 2017 / Accepted: 20 February 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The presence of cocaine and its metabolites and by-products has been identified in different aquatic matrices, making crack cocaine the target of recent studies. The aim of this study was to evaluate the sublethal effects of crack on the brown mussel *Perna perna*. Mussels were exposed to three concentrations of crack cocaine (0.5, 5.0, and 50.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) for 168 h. Gills, digestive glands, and hemolymph were extracted and analyzed after three different exposure times using a suite of biomarkers (EROD, DBF, GST, GPX, LPO, DNA damage, ChE, and lysosomal membrane stability [LMS]). After 48 and 96 h of exposure, EROD, DBF, GST, GPX activities and DNA strand breaks in the gills increased significantly after 48 and 96 h of exposure. Alterations in LMS were also observed in the mussels exposed to all crack concentrations after 96 and 168 h. Our results demonstrated that crack cocaine is metabolized by CYP-like and GST activities in the gills. GPX was not able to prevent primary genetic damage, and cytotoxic effects in the hemocytes were also observed in a dose- and time-dependent response. Our study shows that the introduction of illicit drugs into coastal ecosystems must be considered a threat to marine organisms.

Keywords Illicit drugs · Crack cocaine · Biomarkers · Marine organism · Adverse effects · Bivalves

Introduction

Emerging contaminants are compounds that can cause adverse damage to non-target organisms, and represent a gap in environmental legislation since they are not part of

monitoring programs or environmental quality assessments. Frequent use or abuse of these compounds may constitute sources of contamination for aquatic environments (Gavrilescu et al. 2015). Illicit drugs and their metabolites are considered the newest emerging contaminants, due to their high biological activity and the unknown effects they may have on aquatic organisms (Pal et al. 2013).

Brazil is responsible for 20% of global consumption of cocaine and its by-products. The country is part of the drug traffic route to Europe, mainly through its ports, and is the second-largest market for cocaine and largest consumer of crack cocaine in the world (UNODC 2014, 2016). Crack is a cocaine by-product; it is poorly soluble in water and has a low boiling temperature (90 °C) because of the presence of baking soda in its composition (Florence and Attwood 2006). Crack cocaine is widely consumed due to its low cost and more intense effects and is considered epidemic in urban areas (Ribeiro et al. 2006; Pulcherio et al. 2010).

Cocaine has been quantified in aquatic matrices in many countries and sampled at sewage treatment stations and freshwater environments in Australia, Colombia, Greece, England, France, Spain, Canada, Italy, and Belgium (Van Nuijs et al.

Responsible editor: Cinta Porte

✉ Camilo Dias Seabra Pereira
camilo.seabra@pq.cnpq.br

- ¹ Departamento de Ciências do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Rua Maria Máximo, 168, Santos 11030-100, Brazil
- ² Laboratório de Ecotoxicologia, Universidade Santa Cecília, Rua Oswaldo Cruz 266, Santos 11045-907, Brazil
- ³ Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Infante Dom Henrique s/n, São Vicente 11330-900, Brazil
- ⁴ CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada, CIETEC/IPEN, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Salas 112 e 113, São Paulo 05508-000, Brazil
- ⁵ Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo, Av. Ana Costa 95, Santos 11060-001, Brazil

Published online: 08 March 2018

